



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Genética y Biotecnología**

**Efecto del fluido folicular de alpaca en la maduración  
ovocitaria *in vitro* de alpaca (*Vicugna pacos*)**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Bióloga Genetista  
Biotecnóloga

**AUTOR**

Tania Milagros CASTRO MODESTO

**ASESOR**

Martha Esther VALDIVIA CUYA

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Castro T. Efecto del fluido folicular de alpaca en la maduración ovocitaria *in vitro* de alpaca (*Vicugna pacos*) [Tesis de pregrado]. Lima: Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Genética y Biotecnología; 2018.

---



**Universidad Nacional Mayor De San Marcos**  
(Universidad del Perú, DECANA DE AMÉRICA)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGA GENETISTA BIOTECNÓLOGA  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

Siendo las 15:45 horas del 06 de diciembre de 2018, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** de **TANIA MILAGROS CASTRO MODESTO**.

Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 018-EPGB-2018, la titulando expuso su tesis: **"EFECTO DEL FLUIDO FOLICULAR DE ALPACA EN LA MADURACIÓN OVOCITARIA in vitro DE ALPACA (Vicugna pacos)"**, y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 18..., calificativo: Aprobado con mención honrosa.

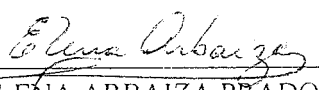
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Genética y Biotecnología, y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el **Título Profesional de Bióloga Genetista Biotecnóloga** a **TANIA MILAGROS CASTRO MODESTO** y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.

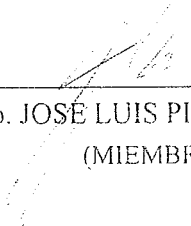
Siendo las 16:30 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 06 de diciembre de 2018.

  
Mg. FERNANDO RETUERTO PRIETO  
(PRESIDENTE)

  
Mg. MARTHA VALDIVIA CUYA  
(ASESORA)

  
Blga. ELENA ARBAIZA PRADO  
(MIEMBRO)

  
Blgo. JOSÉ LUIS PINO GAVIÑO  
(MIEMBRO)

## **AGRADECIMIENTOS**

Mi más sincero agradecimiento

A Dios por haberme permitido llegar hasta aquí y por guiar mi camino día a día.

A mis padres, Oswaldo y Paulina y a mis hermanas, Mili y Janet, por su comprensión y apoyo incondicional a lo largo de todos estos años. Los quiero mucho.

A mi profesora Martha Valdivia, por abrirme las puertas de su laboratorio y por guiarme y apoyarme en el camino de la investigación. Gracias por todo.

A mi amiga Patty, quien me acompañó y apoyó desde el primer día en este proyecto y sin cuya colaboración este trabajo hubiera sido mucho más largo, complicado y menos entretenido. A Zezé, Christian, Stefanny y Natalia quienes también me acompañaron y apoyaron siempre que los necesité. Gracias por su colaboración.

A mis compañeros del Laboratorio de Fisiología de la Reproducción, del que con gran orgullo y satisfacción formo parte. Gracias por su compañerismo.

A mis amigos Bianca, Cathy, Josmar, Mapi, Guido y Jhacky por su amistad y por los gratos momentos compartidos.

Al Proyecto INNOVATE PERU-EC-2017 y al Programa de Promoción de Tesis de Pregrado RR N 06369-R-17 proyecto con código E17100264b.

**DEDICATORIA**

A Paulina, Oswaldo, Mili y Janet

Sin ustedes nada hubiese sido posible.

## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS .....	02
DEDICATORIA .....	03
TABLA DE CONTENIDO .....	04
ÍNDICE DE TABLAS .....	08
INDICE DE FIGURAS .....	10
ABREVIATURAS .....	12
RESUMEN .....	13
ABSTRACT .....	15
I. INTRODUCCIÓN .....	17
II. MARCO TEÓRICO CONCEPTUAL .....	20
2.1 Aspectos generales del desarrollo del ovocito .....	20
2.1.1 Ovogénesis .....	20
2.1.2 Folículo y foliculogénesis .....	22
2.1.3 Dinámica folicular en alpacas .....	26
2.1.4 Interacción ovocito-células de la granulosa .....	26
2.1.5 Maduración <i>in vivo</i> del ovocito .....	27
2.1.6 Ovulación .....	28
2.2 Maduración <i>in vitro</i> del ovocito .....	29
2.2.1 Técnicas de recuperación de los CCO .....	30
2.2.2 Selección de los CCO .....	30
2.2.3 Medio de maduración .....	31
2.2.4 Suplementos de medio de maduración .....	32
2.2.5 Condiciones para la maduración <i>in vitro</i> .....	34
2.3 Fluido folicular .....	36
2.3.1 Componentes del fluido folicular .....	36
2.4 Fecundación <i>in vitro</i> y cultivo de embriones .....	38

2.4.1 Fertilización <i>in vitro</i> .....	38
2.4.2 Cultivo de embriones .....	39
III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS .....	40
3.1 Hipótesis .....	40
3.2 Objetivos .....	40
3.2.1 Objetivo general .....	40
3.2.2 Objetivos específicos .....	40
IV. MATERIALES Y MÉTODOS .....	41
4.1 Lugar de estudio .....	41
4.2 Materiales .....	41
4.2.1 Material biológico .....	41
4.2.2 Medios de Cultivo y Reactivos .....	41
4.2.3 Equipos y materiales de laboratorio .....	42
4.3 Métodos .....	43
4.3.1 Lugar de colección y traslado de muestras biológicas (ovarios) .....	43
4.3.2 Aislamiento del fluido folicular .....	43
4.3.3 Aislamiento y selección de ovocitos .....	44
4.3.3.1 Aislamiento por el método de aspiración .....	44
4.3.3.2 Aislamiento por el método de cortes .....	45
4.3.3.3 Selección de los CCO para cultivo en medio de maduración .....	45
4.3.4 Evaluación de la vitalidad de los CCO .....	46
4.3.5 Cultivo en medio de maduración .....	46
4.3.6 Evaluación de la maduración del ovocito .....	47
4.3.7 Evaluación del estadio nuclear de los ovocitos y de la presencia de ADN fragmentado .....	47
4.3.8 Selección espermática por la técnica de swim-up .....	48
4.3.9 FIV .....	48
4.3.10 Cultivo de embriones .....	49



4.3.11 Valoración del desarrollo embrionario .....	49
4.3.12 Análisis estadístico .....	50
V. RESULTADOS .....	51
5.1 Promedio de CCO aislados y vitalidad .....	51
5.2 Comparación de 2 métodos de aislamiento de los CCO (por aspirado y por cortes) ....	51
5.3 Efecto de la suplementación con FF y SFB en los medios de maduración <i>in vitro</i> sobre los porcentajes de expansión de las células del cumulus y maduración en CCO aislados por el método de aspirado .....	53
5.4 Efecto de la suplementación de los medios de maduración <i>in vitro</i> con FF y SFB sobre los porcentajes de expansión de las células del cumulus y maduración en CCO aislados por el método de cortes .....	54
5.5 Efecto de la suplementación de los medios de maduración <i>in vitro</i> con FF y SFB sobre el estadio nuclear de los ovocitos inmaduros y la presencia de ADN fragmentado.....	56
5.6 Efecto de la suplementación del medio de maduración con FF y SFB y FF+SFB sobre el porcentaje de producción de embriones post FIV.....	58
5.7 Comparación de los porcentajes de maduración y degradación de los ovocitos (evaluado por la presencia de ADN fragmentado) encontrados entre los grupos de CCO aislados por los métodos de aspiración y cortes.....	59
5.8 Efecto de la suplementación del medio de maduración con FF y SFB y FF+SFB sobre el porcentaje de producción de embriones por partenogénesis espontánea .....	61
VI. DISCUSIÓN .....	63
6.1 Efecto de la suplementación de los medios de maduración <i>in vitro</i> con FF y SFB sobre los porcentajes de expansión de las células del cumulus, maduración y producción de embriones .....	63
6.2 Efecto de la suplementación de los medios de maduración con FF y SFB sobre el estadio nuclear presente en los ovocitos inmaduros post cultivo .....	65

6.3 Efecto de la suplementación de los medios de maduración con FF y SFB sobre los porcentajes de degradación de los ovocitos (evaluado por la presencia de ADN fragmentado) post cultivo .....	66
6.4 Efecto del tiempo y temperatura sobre las tasas de maduración <i>in vitro</i> y producción de embriones .....	68
6.5 Efecto del método de colección (aspirado vs cortes) en las tasas de recuperación de CCO morfológicamente normales (clases I y II) .....	70
6.6 Comparación de los porcentajes de maduración y presencia de ovocitos degradados (evaluado por la presencia de ADN fragmentado) post cultivo entre los grupos de CCO aislados por los métodos de aspiración y cortes .....	71
6.7 Producción de embriones por partenogénesis .....	72
VII. CONCLUSIONES .....	74
VIII. RECOMENDACIONES .....	75
IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	76
X. ANEXOS .....	87

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1: Promedio de ovocitos aislados por ovario y vitalidad de los ovocitos .....	51
Tabla 2: Comparación de los métodos de recuperación de los CCOs sobre la cantidad de CCO clases I y II aislados por envío y por ovocito .....	52
Tabla 3: Porcentajes de maduración y expansión de las células del cumulus para los ovocitos obtenidos por el método de aspiración post 32 a 36 horas de cultivo en el medio de maduración con los suplementos correspondientes .....	53
Tabla 4: Porcentajes de maduración y expansión de las células del cumulus para los ovocitos obtenidos por el método de cortes post 32 a 36 horas de cultivo en el medio de maduración con los suplementos correspondientes .....	55
Tabla 5: Estadío nuclear de los ovocitos inmaduros post cultivo en presencia de los suplementos correspondientes .....	57
Tabla 6: Comparación de los porcentajes de producción de embriones entre los suplementos usados .....	59
Tabla 7: Comparación de los porcentajes de maduración y degradación de los ovocitos (evaluado por la presencia de ADN fragmentado) encontrados entre los grupos de CCO aislados por los métodos de aspiración y cortes.....	60
Tabla 8: Comparación de los porcentajes de embriones producidos por partenogénesis espontánea .....	62
Tabla 9: Número de ovarios, CCO de las categorías I y II recuperados por aspiración y cortes y vitalidad de los CCO .....	94
Tabla 10: Porcentajes de expansión de las células del cumulus y maduración de los ovocitos aislados por aspiración y cultivados en los medios con los suplementos evaluados (SFB, FF y SFB+FF).....	95

Tabla 11: Porcentajes de expansión de las células del cumulus y maduración de los ovocitos aislados por cortes y cultivados en los medios con los suplementos evaluados (SFB, FF y SFB+FF).....	96
Tabla 12: Estadíos nucleares encontrados en los ovocitos inmaduros aislados por aspiración.....	97
Tabla 13: Estadíos nucleares encontrados en los ovocitos inmaduros aislados por cortes .	98
Tabla 14: Porcentajes de embriones producidos por los ovocitos madurados en los medios con los suplementos evaluados .....	99

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Ovogénesis .....	20
Figura 2: Esquema de un folículo antral .....	21
Figura 3: Foliculogénesis .....	25
Figura 4: Comparación de la cantidad y promedio de CCO clases I y II aislados mediante los métodos de aspiración vs cortes .....	52
Figura 5: Porcentajes de maduración y expansión de las células del cumulus obtenidos en los 3 medios de maduración suplementados .....	56
Figura 6: Estadío nuclear y presencia de ADN fragmentado en los ovocitos inmaduros post cultivo en presencia de los suplementos correspondientes .....	58
Figura 7: Porcentajes de producción de embriones para los ovocitos madurados en presencia de los suplementos usados .....	59
Figura 8: Comparación de los porcentajes de maduración y presencia de ADN fragmentado entre los ovocitos recuperados por los diferentes métodos de aislamiento de CCO .....	61
Figura 9: Porcentajes de embriones producidos por partenogénesis espontánea en los medios con los suplementos evaluados .....	62
Figura 10: Camal Municipal de Huancavelica .....	87
Figura 11: Preparación de medios y placas de cultivo .....	87
Figura 12: Ovario de alpaca .....	88
Figura 13: Fluido folicular aspirado + solución Dulbecco .....	88
Figura 14: Clasificación morfológica de los complejos cumulus-ovocitos inmaduros. A: Clase I. B: Clase II. C: Clase III y D: Clase IV .....	89
Figura 15: Ovocitos seleccionados para maduración <i>in vitro</i> .....	90
Figura 16: Evaluación de los ovocitos mediante tinción con el colorante vital azul de tripán.....	90

Figura 17: Ovocitos de alpaca post-maduración. A: Ovocito con las células del cumulus expandidas. B: Ovocito inmaduro. C y D: Ovocitos maduros, las flechas indican los cuerpos polares .....91

Figura 18: Ovocitos inmaduros en diferentes estadios de meiosis evaluados por microscopía de fluorescencia. A: Vesícula germinal. B: Metafase I. C: Metafase II y D: Ovocitos con ADN degradado .....92

Figura 19: Embrión de 2 células. B: Embrión de 4 células. C: Mórula y D: Ovocito fecundado (las flechas blancas señalan los pronúcleos y la flecha ploma señala los cuerpos polares. E: Embrión de 2 células F: Mórula (Las fotos D, E & F fueron evaluados por microscopía de fluorescencia) .....93

## ABREVIATURAS

CCO: complejo cumulus-oophorus.

SFB: Suero fetal bovino

FF: Fluido folicular

CO<sub>2</sub>: Dióxido de carbono

FIV: Fertilización *in vitro*

PHE: Penicilamina-Heparina-Hipotaurina

ARN: ácido ribonucleico

FSH: hormona folículo estimulante

LH: hormona luteinizante

PTZ: proyecciones trans-zonales

cAMP: monofosfato de adenosina cíclico

cGMP: monofosfato de guanosina cíclico

PPNC: precursor del péptido natriurético C

PDE3A: fosfodiesterasa 3A

FCE: factor de crecimiento epidérmico

COX2: cicloxigenasa 2

GREM1: gremlin 1

HAS2: hialuronano sintasa 2

PTX3: pentraxin 3

CSA: camélidos sudamericanos

hCG: gonadotropina coriónica humana

GnRH: hormona liberadora de  
gonadotropina

MIV: maduración *in vitro*

O<sub>2</sub>: oxígeno

TCM: medio de cultivo de tejidos

MEM: medio esencial mínimo

BSA: albúmina sérica bovina

ROS: especies reactivas de oxígeno

FOS: fluido oviductal sintético

eCG: gonadotropina coriónica equina

UI: unidades internacionales

msnm: metros sobre el nivel del mar

BFS: buffer fosfato salino

NaCl: cloruro de sodio

rpm: revoluciones por minuto

UNMSM: Universidad Nacional Mayor de  
San Marcos

## RESUMEN

Los estudios relacionados a la aplicación de las técnicas de reproducción asistida en alpaca son aún muy limitados, existiendo aún muchas deficiencias en las técnicas de maduración, fertilización *in vitro* y cultivo de embriones. El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del fluido folicular como suplemento en el medio de maduración sobre las tasas de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca. Las muestras biológicas fueron colectadas en el camal municipal de Huancavelica y trasladadas en una solución de NaCl al 0.9% a 4 °C. En el laboratorio, los complejos cumulus-oophorus (CCO) fueron aislados de los folículos mediante dos métodos (aspiración y cortes) y los CCOs seleccionados fueron colocados en un medio de maduración suplementado con suero fetal bovino (SFB), fluido folicular (FF) o ambos (SFB+FF) y cultivados a 38.5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa durante 32 a 36 horas. La madurez de los ovocitos fue evaluada post-cultivo mediante la presencia del primer cuerpo polar. Para determinar la capacidad de los ovocitos maduros para completar los procesos de fertilización y desarrollo embrionario se realizaron 4 ensayos de FIV. Se trabajó con espermatozoides aislados de la zona caudal del epidídimo los que fueron seleccionados por el método de swim-up. La fertilización se realizó con una concentración de  $2 \times 10^6$  esp/mL en medio HAM suplementado con heparina y PHE como agentes capacitantes. Los espermatozoides y ovocitos se cultivaron juntos bajo condiciones similares a las usadas para la maduración durante 18 horas, luego del cual, los ovocitos fueran lavados y cultivados en medio KSOM suplementado con SFB, piruvato sódico y gentamicina durante 7 días. En primer lugar, se comparó el promedio de CCO aislados mediante los métodos utilizados. Se obtuvo un promedio de 2.1 CCO aislados por ovario mediante el método de aspiración, mientras que con el método de cortes se obtuvo un promedio de 1.2 CCO por ovario, encontrándose diferencia



significativa entre estos resultados ( $p < 0.05$ ). Al evaluar los resultados de maduración, para los ovocitos aislados por el método de aspiración, se observó 24.7% de maduración para el medio suplementado con FF y mientras que cuando el medio estuvo suplementado con SFB y SFB+FF se obtuvo 25% y 19.2% de madurez respectivamente. Mientras que para el grupo aislado por cortes se obtuvieron porcentajes de maduración de 26.1% para el medio suplementado con FF y 33.2% y 9.6% para los medios suplementados con SFB y SFB+FF, sin embargo, para ninguno de los casos se encontró diferencia significativa entre los grupos evaluados ( $p > 0.05$ ). Asimismo, con respecto a las tasas de producción embrionaria se obtuvo un 14.2% de embriones producidos para los ovocitos madurados en el medio suplementado con FF, mientras que para los ovocitos madurados en los medios suplementados con SFB y SFB+FF se obtuvieron tasas de 27.5% y 29.2% respectivamente, sin embargo, al igual que para el caso anterior, no se observó diferencia significativa entre los grupos evaluados ( $p > 0.05$ ). En conclusión, los resultados sugieren que el método de aspiración muestra una mayor proporción de aislamiento de CCO en comparación con el método de cortes, asimismo se demuestra que el FF puede ser usado como un suplemento natural equivalente al SFB en los medios de maduración *in vitro* para ovocitos de alpaca.

**PALABRAS CLAVE:** Alpaca, maduración de ovocitos, fluido folicular, fertilización *in vitro*, *Vicugna pacos*.

## ABSTRACT

Studies related to the application of assisted reproduction techniques in alpaca are very limited, there are still many deficiencies in the techniques of maturation, *in vitro* fertilization and embryo culture. The aim of the present work was to evaluate the effect of follicular fluid as a supplement in the maturation medium on *in vitro* maturation rates of alpaca oocytes. The biological samples were collected at a local slaughterhouse in Huancavelica and transferred in 0.9% NaCl solution at 4°C. In the lab, the cumulus-oophorus complexes (COCs) were isolated from the follicles by two methods (aspiration and slicing) and the selected COCs were placed in a maturation medium supplemented with fetal bovine serum (FBS), follicular fluid (FF) or SFB + FF and cultured at 38.5 °C, 5% CO<sub>2</sub> and 100% of relative humidity for 32 to 36 hours. The maturity of the oocytes was evaluated post-culture by the presence of the first polar body. To determine the ability of mature oocytes to complete the processes of fertilization and embryonic development, 4 IVF trials were performed. We worked with spermatozoa isolated from the caudal area of the epididymis, which were selected by the swim-up method. Fertilization was carried out with a concentration of  $2 \times 10^6$  esp/mL in HAM medium supplemented with heparin and PHE as capacitating agents. The sperm and oocytes were cultured together under conditions similar to those used for maturation during 18 hours, after which the oocytes were washed and cultured in KSOM medium supplemented with FBS, sodium pyruvate and gentamicin for 7 days. First, the average of COCs recovered by the two methods used was compared. An average of 2.1 COCs isolated by ovary was obtained by the aspiration method, while with the slicing method an average of 1.2 COCs was obtained per ovary, finding a significant difference between these results ( $p < 0.05$ ). In relation to the rate of maturation, for oocytes isolated by the aspiration method, with the medium

supplemented with FF 24.7% of oocyte matured was found and when the medium was supplemented with SFB and SFB + FF, the rates for maturation were 25% and 19.2% respectively. For the group of oocytes isolated by slicing, a rate of 26.1% were obtained for medium supplemented with FF and 33.2% and 9.6% for oocytes matured in the media supplemented with SFB and SFB + FF respectively, however, for none of the cases significant difference was found between the groups ( $p > 0.05$ ). For embryo production, a rate of 14.2% were obtained for medium supplemented with FF, while for media supplemented with SFB and SFB + FF, rates of 27.5% and 29.2% respectively were obtained, however, no significant difference was found between the groups ( $p > 0.05$ ). In conclusion, the results suggest that the aspiration method shows a higher proportion of optimal COC isolation compared to the slicing method, likewise it shows that FF can be used as a natural supplement equivalent to SFB for *in vitro* maturation media for alpaca oocytes.

**KEYWORDS:** Alpaca, oocyte maturation, follicular fluid, *in vitro* fertilization, *Vicugna pacos*.

## I. INTRODUCCIÓN

Los camélidos sudamericanos presentan una considerable importancia económica en países de América del sur como Perú, Bolivia, Chile y Argentina, donde representa una de las principales fuentes para la industria textil y particularmente en la región alto andina donde son fuente de carne y lana para muchas familias (Santiani *et al.*, 2016).

En la última década, se ha incrementado el interés en la aplicación de tecnologías de reproducción asistida en camélidos sudamericanos (Apichela, *et al.*, 2015), derivando en un aumento en el número de reportes de su aplicación en la literatura. En el 2014, por ejemplo, se estudió el efecto de 3 variables (edad de la hembra donante de los ovarios, tamaño del folículo del que fueron obtenidos los CCO y presencia o ausencia de SFB en el medio de maduración) sobre las tasas de maduración *in vitro* de ovocitos de alpaca, reportándose un efecto positivo cuando se emplearon folículos de más de 2mm de diámetro (36% de maduración) en comparación con el uso de folículos de menos de 2mm de diámetro (8% de maduración). Así mismo, la suplementación del medio con SFB mostró un efecto positivo en relación a la tasa de ovocitos que alcanzaron la metafase II (57.6%) en comparación con los ovocitos cultivados en medio sin SFB (18.2%) (Leisinger *et al.*, 2014).

Por otra parte, también en el 2014, se evaluó el efecto del tiempo de cultivo sobre las tasas de maduración y división post FIV en alpaca, observando una mayor proporción de ovocitos que alcanzaron la metafase II (75.3%) cuando estos fueron cultivados durante 42hs, en comparación con el cultivo durante 30hs (26.3%), 34hs (52.6%) y 38hs (68.5%). (Chileno *et al.*, 2014). En otro reporte, además del tiempo de maduración (24, 28 y 32 horas), se evaluó el efecto del método de selección espermático usado (swim-up vs percoll) y la tensión de oxígeno (20% vs 5%) presente durante los cultivos *in vitro* en alpaca. Se reportó un porcentaje significativamente

mayor de ovocitos maduros cuando el cultivo se realizó durante 32hs (65.1%) en comparación con cultivos realizados durante 24 y 28 horas (46.1% y 50.3% respectivamente), mientras que la tasa de producción de blastocistos no se vio afectadas ni por la variación de la tensión de O<sub>2</sub> o por el método de selección espermática (Ruiz *et al.*, 2017).

Dentro de las técnicas de reproducción asistida, el empleo de la fertilización *in vitro*, en particular, representa una alternativa para lograr la propagación de los animales genéticamente superiores desde el punto de vista de la producción, especialmente los que poseen fibra fina y de colores naturales (Miragaya *et al.*, 2006), y para la preservación de los camélidos silvestres (Ruiz, 2011; citado por Torres, 2017). Sin embargo, a pesar del incremento en el número de reportes en relación al estudio y la aplicación de las tecnologías de reproducción asistida en estas especies, su validación y aplicación comercial permanece en los primeros estadios de su desarrollo, existiendo aún muchas deficiencias en las técnicas de maduración, fertilización *in vitro* y cultivo de embriones aplicadas en alpaca y especies afines (Brown, 2000; Morton *et al.*, 2007; Leisinger *et al.*, 2014; Ruiz *et al.*, 2017).

La maduración *in vitro* de ovocitos representa el punto de partida de no solo de la fertilización *in vitro* y producción de embriones, sino de otras técnicas de reproducción asistida como clonación, producción de animales transgénicos e investigación en células madre (Kakkassery *et al.*, 2010). Sin embargo, en alpaca y en general en todas las especies, es aún un gran reto el desarrollo de sistemas de cultivo *in vitro* capaces de mantener los largos procesos de crecimiento y maduración, mediante los cuales el ovocito podrá adquirir la capacidad tanto de completar la maduración meiótica como de mantener el desarrollo embrionario (Silva *et al.*, 2016).

Entre las alternativas empleadas, para la mejora de la efectividad de los sistemas de maduración de ovocitos *in vitro*, estudios en porcino y bovino demostraron que la suplementación de los medios de maduración con fluido folicular (FF) puede promover

la maduración y/o la fertilización *in vitro* de los ovocitos y su posterior desarrollo embrionario (Algriany *et al.*, 2004; Klumpp *et al.*, 2004; Bijttebier *et al.*, 2008; Ito *et al.*, 2008; Agung *et al.*, 2010).

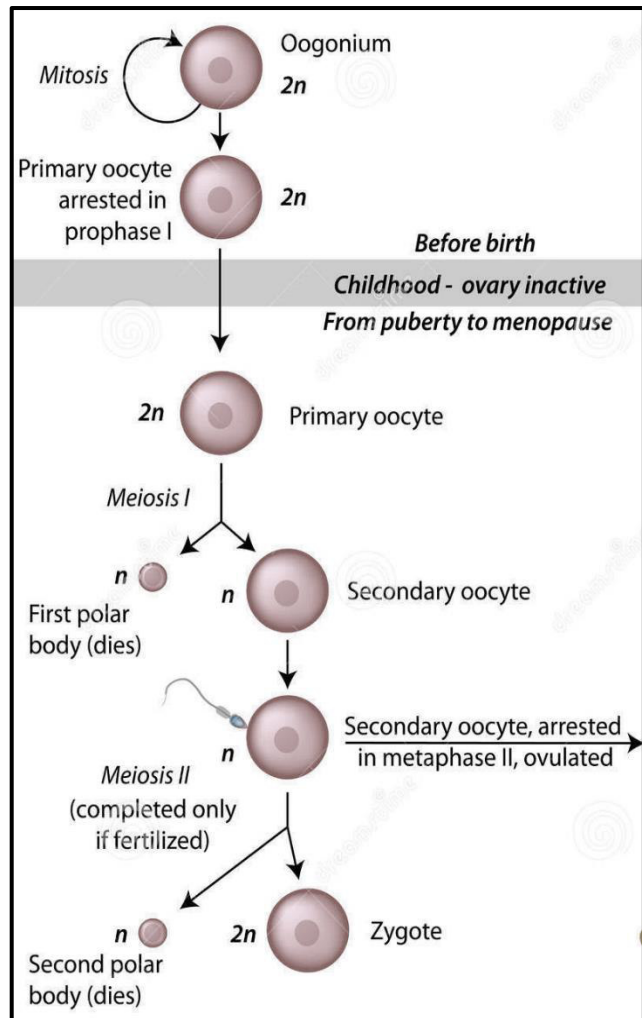
En base a lo mencionado, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto del FF como suplemento natural del medio de maduración para ovocitos de alpaca.

## II. MARCO TEÓRICO

### 2.1 Aspectos generales del desarrollo del ovocito

#### 2.1.1 Ovogénesis

La ovogénesis abarca los procesos de diferenciación, crecimiento y maduración, durante los cuales el ovocito se prepara para la fertilización y desarrollo embrionario (Gilbert, 2005). Durante este proceso, el ovocito acumula los componentes que serán necesarios para iniciar la progresión del ciclo celular, completar la meiosis y mantener el desarrollo embrionario temprano, por lo que el éxito del desarrollo embrionario se basa en la ejecución correcta y eficiente de estos procesos cruciales (Van Woudenberg, *et al.*, 2012).



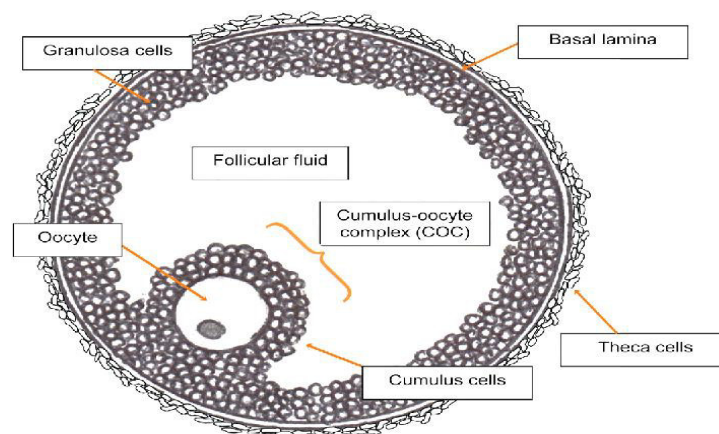
<https://www.alilamedicalmedia.com/es>

La ovogénesis se inicia con las **Ovogonias**, que se derivan de las células germinales primordiales en el embrión y culminan con la formación de los ovocitos en metafase II (Figura 1) (Gigli *et al.*, 2006). En un primer momento las ovogonias se dividen para formar un número limitado de células precursoras de gametos femeninos. En el embrión humano, por ejemplo, mil o más ovogonias se dividen rápidamente para formar casi 7 millones de células germinales, sin embargo, luego de este periodo, la mayor parte de las ovogonias

mueren, mientras que las restantes entran a la primera división meiótica. Estas últimas células son denominadas ovocitos primarios, y progresan a través de la primera profase meiótica hasta el estadio de diploteno, punto en el que se detienen hasta la madurez sexual de la hembra (Gilbert, 2005).

Al alcanzar la madurez sexual grupos de ovocitos primarios reinician periódicamente la meiosis. Durante este proceso el núcleo del ovocito primario, denominado vesícula germinal, se destruye y el huso de la metafase migra hacia la periferia de la célula. Al término de la primera división meiótica, una de las dos células hijas carece casi por completo de citoplasma y es denominada primer cuerpo polar, mientras que la otra célula retiene casi la totalidad del volumen de los constituyentes celulares y es denominada ovocito secundario (Gilbert, 2005).

Durante la segunda división meiótica, al igual que durante la metafase I, la mayoría del citoplasma es retenido por el gameto femenino maduro (óvulo), y un segundo cuerpo polar recibe poco más que un núcleo haploide. De esta manera, la ovogénesis conserva el volumen citoplasmático del ovocito en una célula en lugar de separarlo. El gameto formado contiene una reserva de enzimas citoplasmáticas, ARNm, organelas y sustratos metabólicos, constituyendo un citoplasma sorprendentemente complejo el cual es necesario para iniciar y mantener el metabolismo y desarrollo embrionario (Gilbert, 2000).



**Figura 02:** Esquema de un folículo antral.

*Combelles, 2013*



### 2.1.2 Folículo y foliculogénesis

El folículo es la unidad estructural y funcional de los ovarios, y consiste de una célula gamética funcionalmente inmadura (ovocito), rodeada por células diploides denominadas de la granulosa, y por fuera de estas, las células de la teca, también diploides (Gigli *et al.*, 2006; Hutt, *et al.*, 2007) (Figura 2).

La foliculogénesis, por otro lado, se define como el proceso de formación, crecimiento y diferenciación folicular (Gigli *et al.*, 2006), que tiene por finalidad la producción de un folículo maduro (Conbelles, 2013). Este proceso está compuesto por 2 fases (Figura 3), la primera se caracteriza por la formación e inicio del crecimiento de los folículos primordiales, así como el crecimiento de los folículos primario y secundario; mientras que en la segunda fase se forman los folículos terciario y preovulatorio (Araujo *et al.*, 2014).

- **Folículo primordial**

En los ovarios, los gametos femeninos se almacenan bajo la forma de folículos primordiales, que están compuestos por ovocitos pequeños y rodeados por una sola capa de células de la granulosa y por una membrana basal. (Gilbert, 2005; Hutt, *et al.*, 2007). La formación de los folículos primordiales ocurre mientras que el ovocito se encuentra en el estadio paquitenio de la meiosis para luego quedar arrestado durante el diploteno. (Gilbert, 2005).

Periódicamente grupos de folículos primordiales son liberados de su estado de dormancia para entrar en la fase de crecimiento (Hutt, *et al.*, 2007).

- **Folículo primario**

Luego de la activación de los folículos primordiales las células de la granulosa gradualmente se transforman de células planas a células cuboideas. Así, los folículos primarios constan del ovocito rodeado de una sola capa de células cuboideas (Gilbert, 2005).

- **Folículo secundario**

Los folículos secundarios se caracterizan por poseer 2 o más capas de células cuboideas de la granulosa. Además, comienza el depósito de material para la formación de la zona pelúcida y los gránulos corticales, se forma la capa de células de la teca, se inicia la síntesis de ARN en el ovocito y aparece la capacidad de respuesta a las gonadotropinas (Gilbert, 2005).

- **Folículo terciario o pre-antral**

La progresión hacia la fase de folículo pre-antral es promovida por estímulos locales que involucran principalmente interacciones directas entre las células de la granulosa y el ovocito para la producción local de hormonas (como la FSH) y factores de crecimiento (como GDF9 y BMP-15) (Hutt, *et al.*, 2007). Esta fase se caracteriza por la formación de la zona pelúcida, la adquisición de la capacidad para completar la meiosis, la proliferación de las células de la granulosa, el reclutamiento de las células de la teca hacia la lámina folicular basal, el inicio de la formación de una cavidad antral que se llenará con fluido folicular y un aumento dramático del volumen del ovocito (Pedersen, 1969; citado por Hutt, *et al.*, 2007).

- **Folículo antral o folículo de De Graff**

El folículo de De Graff corresponde al estadio final del desarrollo folicular. Se caracteriza por la presencia de un antro lleno de fluido folicular y existen 2 tipos de células de la granulosa, las células de la granulosa murales y un tipo especializado de células de la granulosa denominado células del cumulus. Ambos tipos celulares definen la estructura interna del folículo. Las células del cumulus rodean al ovocito, formando el complejo cumulus-oophorus (CCO), mientras que las células de la granulosa murales forman el revestimiento interno del folículo. El folículo de graff, además, está envuelto por una lámina especializada de matriz extracelular

denominada lámina basal, que separa el folículo interno del tercer tipo de células somáticas presentes en el folículo, denominadas células de la teca. Las células de la teca son una capa celular vascularizada que define el límite externo del folículo antral (Figura 02) (Combelles, 2013).

Este estadio es desencadenado por influencia de la hormona LH se involucra la reactivación de la meiosis y maduración citoplasmática resultando en la generación de un ovocito maduro (Gilbert, 2005; Hutt, *et al.*, 2007). Además, se establecen las comunicaciones por uniones gap mediadas por proyecciones trans-zonales (PTZ) que permitirán una activa comunicación (a través del intercambio de moléculas) entre el ovocito y las células del cumulus (Gilbert, 2005; Hutt, *et al.*, 2007).

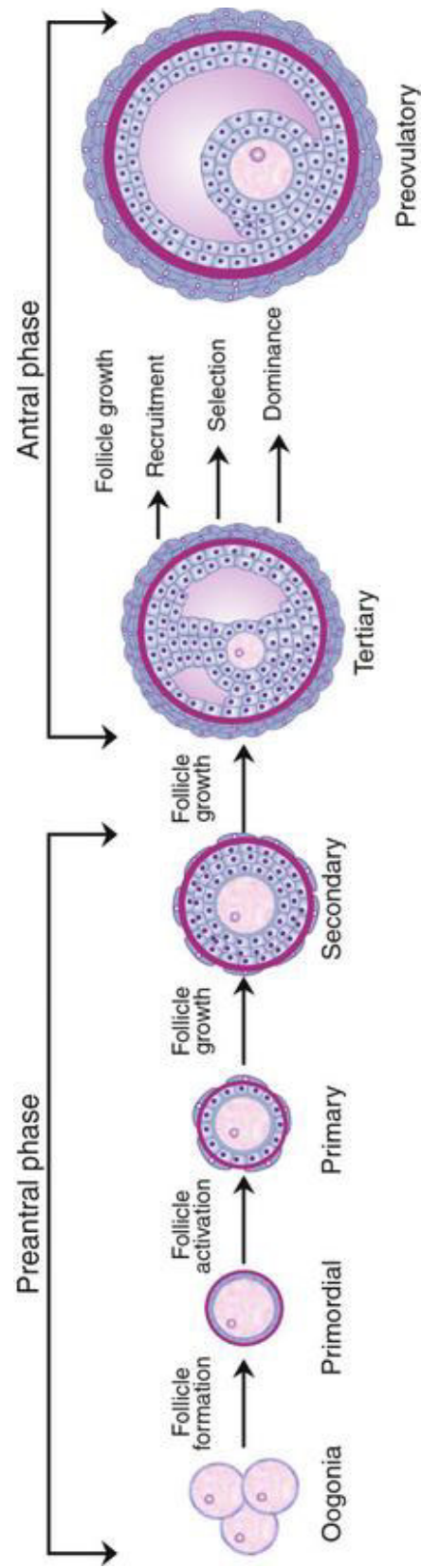


Figura 03: Foliculogénese

Araujo et al., 2013

### **2.1.3 Dinámica folicular en alpacas**

En ausencia de machos, las alpacas hembras presentan ondas foliculares anovulatorias sucesivas, con periodos de crecimiento, maduración y regresión, que continúan hasta que se presente el estímulo para la ovulación (Adams *et al.*, 1990; citado por López, 2014).

Cada onda folicular inicia con una fase de reclutamiento de una cohorte de folículos (2 o 3) de 2 a 3 mm de diámetro y que crecerán hasta alcanzar un tamaño de 4 a 5mm. Al final de cada onda folicular solo un folículo llega a ser el dominante, alcanzando un tamaño mayor a 7 mm (folículo ovulatorio), mientras que el resto de folículos entran en regresión (Adams *et al.*, 1990; citado por López, 2014). El folículo dominante presenta 3 fases de desarrollo: crecimiento (incremento del diámetro folicular), estática (cambios mínimos en el diámetro) y regresión (disminución del diámetro) (Stevenson, 2007; citado por López, 2014), si el apareamiento no ha tenido lugar el folículo dominante sufre regresión, a la par que un nuevo grupo de folículos son reclutados (Ginther *et al.*, 1989; citado por López, 2014).

El tiempo promedio en que se desarrolla una onda folicular es de 12 días. El periodo de crecimiento dura en promedio de 4 días (3-5 días), la fase estática en promedio 4 días (2-8) y la fase de regresión un promedio de 4 días (3-5). En un 85% de los casos el crecimiento folicular se alterna en ambos ovarios (Bravo y Sumar, 1989; López, 2014).

### **2.1.4 Interacción ovocito-células de la granulosa**

La señalización bidireccional entre las células somáticas y el ovocito son mediadas por interacciones paracrinas y regulan el crecimiento de los folículos de cada cohorte. Estas señalizaciones, cambian continuamente en el tiempo con la finalidad de sincronizar el desarrollo folicular con la maduración del ovocito (Dumesic *et al.*, 2015). El fundamento de la interacción ovocito-células de la granulosa se basa parcialmente en contactos altamente específicos denominados proyecciones trans—zonales, que

se establecen desde el inicio de la foliculogénesis y son activamente modificadas durante el curso del desarrollo folicular (Hutt, *et al.*, 2007). Las proyecciones transzonales son procesos citoplasmáticos compuestos de microtúbulos, microfilamentos y filamentos intermedios que se extienden desde las células de la granulosa y pasan a través de la zona pelúcida para interactuar directamente con el citoplasma del ovocito. De esta manera, estas proyecciones el transporte de nutrientes y moléculas pequeñas (como sustratos biosintéticos y señales de arresto de la meiosis) entre el citoplasma de las células de la granulosa y el ovocito (Hutt, *et al.*, 2007).

Las células de la granulosa y de la teca cumplen la función de mantenimiento del ovocito durante su desarrollo, principalmente mediante la entrega de nutrientes, moléculas informativas, precursores metabólicos, factores de crecimiento y hormonas, que permitirán que el ovocito pueda adquirir las funciones necesarias para la maduración y desarrollo posterior (Cecconi & Colonna, 1996; citado por Hutt, 2007; Kakkassery, *et al.*, 2010; Wigglesworth, 2013; Casillas, *et al.*, 2014). Las células del cumulus, por otro lado, secretan factores que gatillan la maduración meiótica. Sin embargo, esta capacidad es dependiente del estadio de desarrollo folicular ya que, por ejemplo, las células del cumulus provenientes de folículos antrales pequeños carecen de esta capacidad, incluso tras estimulación con gonadotropinas (Silva *et al.*, 2016).

El ovocito por su parte, juega un papel activo y dominante en el control del crecimiento del folículo mediante la síntesis de factores que regulan la proliferación, supervivencia, diferenciación y función de las células de la granulosa, el reclutamiento de las células de la teca y la secreción de los componentes de la matriz extracelular (Dias, *et al.*, 2014; Casillas, *et al.*, 2015).

### **2.1.5 Maduración *in vivo* del ovocito**

La maduración del ovocito es el proceso que consiste en la reactivación de la primera división meiótica hasta la expulsión del primer cuerpo polar, reduciendo la carga

cromosómica de la especie a la mitad, y la maduración citoplasmática, con la finalidad de preparar al ovocito para los procesos de fertilización y desarrollo embrionario (Gordon, 1994; citado por Chileno & Cainzo, 2014; Yang & Chian, 2017).

Los ovocitos al inicio de cada ciclo folicular se encuentran detenidos en la profase I (bajo la forma de vesícula germinal) por medio de niveles elevado de cAMP. Para mantener este arresto meiótico las células de la granulosa producen el precursor del péptido natriurético C (PPNC), el que se une a su receptor en las células del cumulus, resultando en la producción de cGMP, el que luego se transfiere al ovocito a través de las uniones gap para inhibir a la fosfodiesterasa 3A (PDE3A), previniendo de esta manera la hidrólisis del cAMP (Dumesic *et al.*, 20015). Con el pico de LH se reduce el contenido folicular de cGMP y se cierran las uniones gap lo que resulta en la caída de la concentración de cAMP y por ende el término de la inhibición meiótica. Al mismo tiempo se incrementa la síntesis de proteínas similares al factor de crecimiento epidérmico (FCE) (anfirregulina, epirregulina y betacelulina) por las células de la granulosa, las que al interactuar con factores derivados del ovocito activan la ruta MAPK para la reanudación de la meiosis y con la expansión de las células del cumulus como respuesta a la acción de las enzimas COX2, GREM1, HAS2 y PTX3. El resultado es un ovocito capaz de sufrir la ruptura de la vesícula germinal para producir un ovocito haploide en metafase II y capaz de la maduración citoplasmática, fertilización y desarrollo embrionario (Dumesic *et al.*, 20015).

### **2.1.6 Ovulación**

La ovulación consiste en la ruptura del folículo dominante y la salida del ovocito para la fecundación. En los rumiantes este evento es inducido por un pico pre-ovulatorio de la hormona LH, pero a diferencia de la mayoría de especies domésticas en los camélidos sudamericanos la elevación de los niveles de estradiol asociados al crecimiento folicular no es suficientes para desencadenar este pico y es necesario el estímulo físico de la cópula (ovulación inducida) para lograr el impulso nervioso

necesario que desencadenará la liberación del ovocito (Fernández Baca, 1971). A este respecto, se ha planteado la existencia de un factor potente en el plasma seminal de las alpacas machos que induciría el pico de LH que finalmente desencadenaría la ovulación (Adams *et al.*, 2005; citado por Gigli *et al.*, 2006).

Tras la cópula las concentraciones plasmáticas de estradiol no varían hasta aproximadamente 22 horas después cuando tienden a declinar (Bravo *et al.*, 1990; citado por López, 2014). La ovulación puede ocurrir entre las 26 a 30 horas después de la cópula (Adams *et al.*, 1990) o puede ser inducida artificialmente entre las 24–30 horas post-inyección de las hormonas gonadotropina coriónica humana (hCG), hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) o de la hormona LH (Fernández Baca, 1971; Novoa, 1991; Sumar, 1997; Leyva y García, 1999a; Aller *et al.*, 1999; Huanca *et al.*, 2001). Generalmente solo un ovocito es liberado durante la ovulación, sin embargo, se han reportado ovulaciones múltiples en el 10% de las hembras luego de un apareamiento natural (Brown, 2000).

## **2.2 Maduración *in vitro* del ovocito**

Los estudios sobre maduración *in vitro* (MIV) de ovocitos de mamíferos se remontan al año 1935, con Pincus y Enzmann (citado por De Matos, 1999), quienes observaron que los ovocitos de conejo terminaban la meiosis espontáneamente luego de ser liberados de los folículos y fueran colocados en un medio de cultivo.

La MIV puede definirse como una técnica mediante la cual los ovocitos inmaduros son removidos de los folículos y cultivados *in vitro* en medios que brinden las condiciones apropiadas para que los ovocitos alcancen el estadio de metafase II y puedan llevar a cabo las funciones necesarias para la fecundación y desarrollo embrionario posterior (Herrera *et al.*, 2009; Yang & Chian, 2017).



### 2.2.1 Técnicas de recuperación de CCO

- **Técnica de aspiración de folículos**

La aspiración es el método más usado para la recuperación de los CCO. Se realiza por medio del empleo de una jeringa y agujas que varían del 18G al 21G, y consiste en la aspiración del contenido de los folículos que se encuentran en la superficie del ovario (Chuquitaype, 2015; Torres, 2017).

- **Técnica de cortes**

La técnica de cortes consiste en hacer cortes superficiales a la superficie del ovario, para permitir la liberación del contenido de los folículos, por medio del uso de una hoja de bisturí. Diversos trabajos han reportado un mayor rendimiento de esta técnica en la recuperación de los CCO en comparación con otros métodos de aislamiento como la aspiración o la punción de folículos (Pawshé *et al.*, 1994; Shirazi *et al.*, 2005; Mehmood, *et al.*, 2011; Chuquitaype, 2015, Turpo *et al.*, 2015).

### 2.2.2 Selección de los CCOs

La morfología del complejo cumulus-ooforos tiene un papel importante en la maduración *in vitro* de ovocitos. Encontrándose que los ovocitos con múltiples capas de células del cumulus (3 o más capas) presentan mejores tasas de maduración por lo que es necesaria una adecuada clasificación y selección de los CCO antes al inicio del cultivo (Kakkassery, *et al.*, 2010).

En base a características morfológicas apreciables al microscopio de luz (número y compactación de las capas de células del cumulus que rodean al ovocito y homogeneidad de citoplasma), se desarrolló un método de clasificación de los CCO con la finalidad de predecir la capacidad de desarrollo en los sistemas de maduración *in vitro* (De Loos *et al.*, 1989). A lo largo del tiempo se han realizado algunas modificaciones a este método, pero manteniendo las principales características

evaluadas. En general los complejos cumulus-oophorus pueden clasificarse en 4 categorías:

- **Clase 1**

CCO con más de 5 capas completas de células del cumulus que rodean completamente al ovocito y citoplasma del ovocito oscuro homogéneo.

- **Clase 2**

CCO con menos de 5 capas de células del cumulus completas y con citoplasma del ovocito oscuro homogéneo.

- **Clase 3**

CCO con capas de células del cumulus presentes, pero menos compactas y citoplasma del ovocito no homogéneo

- **Clase 4**

Ovocito con citoplasma heterogéneo o fragmentado y con las células del cumulus disgregadas o ausentes en su totalidad. (Sánchez *et al.*, 2003, citado por Torres, 2017)

En general se considera que solamente los ovocitos de categorías 1 y 2 poseen elevado potencial para desarrollarse a embriones por fertilización *in vitro* en comparación con las categorías 3 y 4 (Lonergan *et al.*, 1991, citado por Torres, 2017).

### **2.2.3 Medio de maduración**

Para la maduración *in vitro* de ovocitos se han utilizado diferentes medios de cultivo, entre los que se pueden mencionar a los medios Ham's F-10, Ham's F-12, Krebs Ringer Bicarbonato modificado, TCM-199, MEM, Tyrodes y Waymouth MB752/1. Todos estos medios presentan en su composición una mezcla de sales inorgánicas, vitaminas, aminoácidos, glucosa, piruvato sódico, hipoxantina, timidina y rojo fenol como indicador del pH. Entre ellos, el TCM-199 es el medio más usado y con mejores

resultados y está compuesto por sales de Earl's con HEPES y bicarbonato como estabilizante del pH (Chuquitaype, 2015; Torres, 2017).

Además, se ha observado que la maduración *in vitro* está influenciada por la adición de sustratos energéticos, proteínas, fluidos biológicos y/o hormonas al medio de cultivo. Los sustratos energéticos exógenos como glucosa, piruvato y amino ácidos tienen influencia en la maduración y el desarrollo embrionario temprano. Por su parte las gonadotropinas añadidas a los medios incrementan las tasas de maduración, fertilización y capacidad de desarrollo. (Kim, *et al.*, 2008). De esta manera, la composición del medio de cultivo es un factor que puede limitar la eficiencia de las tecnologías reproductivas, ya que la maduración incompleta de los ovocitos está asociada a las bajas tasas de éxito de la producción de embriones, sugiriendo que el medio de cultivo puede ser deficiente en factores que faciliten tanto la maduración citoplasmática como la nuclear (Oberlender, *et al.*, 2013).

#### **2.2.4 Suplementos del medio de maduración**

- **Antibióticos**

El uso de antibióticos es empleado en todos los medios durante el proceso de maduración *in vitro*, desde las soluciones usadas para el transporte del material biológico hasta los medios de cultivo, empleándose diferentes antibióticos y antimicóticos (kanamicina, penicilina y gentamicina). La finalidad del uso de estos agentes es evitar la contaminación de las muestras que muchas veces es obtenida de camales o centros de beneficio (Chuquitaype, 2015).

- **Proteínas**

Las proteínas pueden servir como fuente de nitrógeno, además de actuar como agentes quelantes de iones metálicos tóxicos y antioxidantes dentro del medio de cultivo (Jee, *et al.*, 2008). Los suplementos proteicos más empleados dentro de los medios de cultivo son la albúmina sérica bovina (BSA) y el suero fetal bovino (SFB).

Ambos son empleados para la producción de una alta tasa de blastocistos, debido a que facilitan el transporte de fluidos a través de la membrana celular, así como también favorecen la expansión de las células del cumulus y la reactivación de la meiosis (Chuquitaype, 2015).

- **Hormonas**

Las hormonas FSH y LH desempeñan un papel importante en el proceso de maduración *in vivo*, por lo que su uso es rutinario como suplementos en los medios para la maduración *in vitro* (Torres, 2017). Las gonadotropinas provocan un aumento significativo en la cantidad de cAMP en las células de la granulosa e inducen la maduración del ovocito. La LH mejora las condiciones de maduración, modificando el ambiente nutricional por medio de un aumento de la energía disponible, adicionalmente impide los efectos inhibitorios que actúan sobre el ovocito, permitiendo la reanudación de la meiosis. La FSH, por su parte, es de gran importancia para el mantenimiento de la morfología normal del ovocito y las células de la granulosa durante los cultivos *in vitro*. Su uso estimula la proliferación de las células de la granulosa, la secreción de estradiol y progesterona e induce la expansión de las células del cumulus (Araujo *et al.*, 2014; Torres, 2017).

- **Factores de crecimiento**

En ovocitos de ratón sometidos a maduración *in vitro*, se ha reportado que la presencia del factor de crecimiento epidérmico (FCE) estimula significativamente la expansión de las células cumulus (Downs, 1989, citado por Daen, 1994).

- **Agentes antioxidantes**

Una de las principales causas para la menor calidad y potencial de desarrollo de los ovocitos madurados *in vitro* en comparación con los madurados *in vivo* es debido al alto nivel de especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas durante los procesos *in vitro* (Zhao *et al.*, 2018). Los niveles elevados de ROS producidos *in vitro* se deben

principalmente a eventos como exposición a la luz, concentraciones elevadas de oxígeno y concentraciones elevadas de metabolitos y sustratos que no está presentes *in vivo* (Remião *et al.*, 2016). Diversos reportes han mostrado los efectos beneficiosos de la adicción de agentes antioxidantes en los medios de maduración. Entre los agentes antioxidantes comúnmente usados podemos nombrar, por ejemplo, al tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C) y melatonina entre otros (Dalvit, *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2018).

### **2.2.5 Condiciones para la maduración *in vitro***

Las condiciones de cultivo son de gran importancia para el éxito de la maduración *in vitro*, ya que pequeñas alteraciones en cualquiera de sus parámetros pueden afectar el potencial de maduración de los ovocitos y consecuentemente el desarrollo embrionario (Jee, *et al.*, 2008).

- **Temperatura**

Los cambios de temperatura son relevantes para el desarrollo de los embriones, sobre todo durante el proceso de maduración del ovocito. En general, para diversas especies la temperatura empleada para el cultivo de ovocitos corresponde a 38.5 °C, la cual debe ser mantenida durante todo el tiempo que dure el cultivo (Chuquitaype, 2015). Sin embargo, en camélidos sudamericanos diversos grupos han empleado 39°C como temperatura de cultivo (Ratto, 2005; Chileno & Cainzo, 2014; Arriaga, *et al.*, 2014) con tasas de maduración equivalentes a las obtenidas por los grupos que emplearon 38.5 °C como temperatura de cultivo (Leisinger, *et al.*, 2014; Chuquitaype, 2015; Pérez-Durand, *et al.*, 2017; Ruiz, *et al.*, 2017; Torres, 2017).

- **Mezcla de gases**

Para el cultivo de embriones se usan comúnmente 2 clases de ambientes gaseosos. El cultivo con 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de aire y el cultivo con 5% de CO<sub>2</sub>, 5% de O<sub>2</sub> y 90% de N<sub>2</sub>, éste último responde a la escasa cantidad de oxígeno presente en el tracto

reproductor de la hembra, dado que cantidades superiores de O<sub>2</sub> pueden derivar en la generación de ROS (especies reactivas de oxígeno) (Chuquitaype, 2015).

- **pH**

El pH del medio de cultivo debe mantenerse dentro de rangos similares al del plasma sanguíneo, aproximadamente 7.4. para mantener estas condiciones los medios de cultivo usualmente empleados contienen bicarbonato de sodio, HEPES para regular las variaciones de alcalinidad y acidez y rojo fenol como indicador de pH (Chuquitaype, 2015).

- **Tiempo de cultivo**

Los tiempos de cultivo son variables y responden a los requerimientos de la especie con la que se esté trabajando. En porcino, por ejemplo, se usan rangos de tiempo que varían entre 42 y 48 horas (Yuge *et al.*, 2003; Yucra *et al.*, 2008; Sha *et al.*, 2010 & Fernández-Reyes, *et al.*, 2012), mientras que en bovino se utilizan tiempos de cultivo mucho menores (22-24 horas) (Beker, *et al.*, 2012 & Quintanilla, *et al.*, 2015).

En camélidos se ha observado la necesidad de tiempos de maduración prolongados, en comparación con otras especies domésticas, hecho que se ha asociado con las características propias de la especie, en particular, debido a que *in vivo* la ovulación ocurre a las 30 horas posteriores al estímulo de la cópula (Chileno & Cainzo, 2014). Por ejemplo, se ha reportado la obtención de tasas de maduración en ovocitos de alpaca de 68.5% y 75.3% luego de 38 y 42 horas de cultivo respectivamente (Chileno & Cainzo, 2014). Mientras que, en otro reporte se evaluó el efecto de 3 tiempos de cultivo (24, 28 y 32hs) sobre las tasas de maduración en ovocitos de alpaca y producción de embriones luego de FIV, hallándose una mayor proporción de ovocitos de alpaca en metafase II (65.1%), así como una mayor proporción de blastocistos (29.1%) luego del cultivo durante 32 horas (Ruiz y col., 2017).

## 2.3 Fluido Folicular

El fluido folicular (FF) es producto de la transferencia de los componentes del plasma sanguíneo a través de la barrera sanguíneo-folicular y del metabolismo de las células de la teca y la granulosa (Bijttebier, 2008; Ducolomb, *et al.*, 2013). Corresponde a una mezcla compleja de electrolitos, proteínas, hormonas, factores de crecimiento, esteroides, nutrientes y otras moléculas (Wise, 1987, citado por Klumpp, 2004; Gilbert, 2005; Ito, *et al.*, 2008; Germoush, *et al.*, 2018). Sin embargo, en todos los mamíferos, su composición está sujeta a marcadas alteraciones a través del ciclo menstrual o estral, y regula varias funciones incluidas la inhibición meiótica del ovocito, la expansión de las células del cumulus, el desarrollo del cuerpo lúteo, la formación de pronúcleo masculino, la nutrición tanto del ovocito como de las células adyacentes y la adquisición de la competencia para el desarrollo posterior, (Klumpp, 2004; Jee, *et al.*, 2008; Ducolomb, *et al.*, 2013).

En cerdo se ha reportado que el suplementar los medios de maduración *in vitro* con fluido folicular presenta efectos beneficiosos en la maduración nuclear, fertilización y desarrollo embrionario. Ha sido bien documentado que la maduración de CCO de porcino en presencia de FF y FSH, mejora el grado de expansión de las células del cumulus e incrementa las tasas de metafase II, la formación del pronúcleo masculino y las tasas de clivaje. Sin embargo, también se han reportado resultados contradictorios con respecto al efecto de la suplementación solo con FF de porcino sobre la maduración nuclear y la formación de blastocistos, datos que se plantea pueden ser explicados por diferencias con respecto al origen del FF usado (Algriany *et al.*, 2004).

### 2.3.1 Componentes del fluido folicular

- **Componentes inorgánicos**

El FF es una solución ligeramente viscosa con un pH de 7.4. Se ha reportado la presencia de varios componentes inorgánicos en concentraciones similares a las del

suero con solo algunas diferencias. En bovino, por ejemplo, se reportaron concentraciones de sodio y potasio más altas en el FF en comparación con el suero. Sin embargo, las concentraciones de magnesio, zinc, cobre, cloruros y fosfatos inorgánicos fueron similares a los encontrados en el suero bovino (Petkov, *et al.*, 1960, citado por Klumpp, 2004).

- **Carbohidratos**

Análisis bioquímicos revelaron que la glucosa representó el 75% del total de carbohidratos presentes en el FF, mientras que la fructosa estuvo presente en una fracción menor (Lutwak-Mann, 1954, citado por Klumpp, 2004).

- **Lípidos y vitaminas**

El colesterol, vitamina C y vitamina A fueron identificados en el FF bovino (Zachariae & Jensen, 1958, citado por Klumpp, 2004).

- **Proteínas**

La mayoría de las proteínas del plasma han sido identificadas en el FF bovino, sin embargo, sus concentraciones fueron menores a las encontradas en el suero. En bovino, se ha reportado una concentración del 75% de las proteínas del suero en el FF, mientras que en el FF humano la concentración de proteínas del suero presentes en el FF fue solo de un 50% (Caravaglios y Cilotti, 1957, citado por Klumpp, 2004).

- **Enzimas**

Varias enzimas han sido identificadas en el FF con concentraciones que se van incrementando a lo largo del desarrollo folicular. Las enzimas lactato deshidrogenasa, transaminasas, fosfatasas alcalinas, hialuronidasa, endopeptidasa y collagenasa han sido identificadas en el FF bovino y juegan un rol importante en la ovulación (Klumpp, 2004).



- **Gonadotropinas y esteroides**

Tanto la FSH como la LH se encuentran presentes en el FF desde donde promueven la formación del antro y contribuyen a la vascularización de las células de la teca interna durante el desarrollo folicular. Además de las gonadotropinas, las hormonas esteroideas como los estrógenos, andrógenos y progestágenos, han sido identificadas en el fluido folicular, siendo el estrógeno el de mayor concentración cuando los folículos alcanzan un diámetro de 15mm (Klumpp, 2004). A lo largo de los diferentes estadios del ciclo reproductivo se han reportado variaciones de las concentraciones de las hormonas esteroideas; así mismo las concentraciones también varían entre diferentes folículos en el mismo animal y entre animales de la misma especie (Klumpp, 2004).

## **2.4 Fecundación *in vitro* y cultivo de embriones**

### **2.4.1 Fertilización *in vitro***

La técnica de fertilización *in vitro* fue desarrollada en 1949, pero no fue hasta 1978 cuando Steptoe y Edwards establecieron el proceso en gran detalle, resultando en el primer bebé humano nacido vivo por esta técnica (Casillas, *et al.*, 2015).

La fertilización *in vitro* (FIV) se ha definido como el cultivo de los espermatozoides junto con ovocitos maduros fuera del tracto reproductor femenino para permitir la fertilización (Mango, 2015; Lopera, 2009; citado por Torres, 2017). Mediante esta técnica se busca emular las condiciones y eventos que suceden en la región ampular del oviducto, específicamente la interacción de los gametos y la formación de los pronúcleos (Greve *et al.*, 1991; citado por Torres, 2017).

Para lograr la fertilización las células espermáticas deben alcanzar su capacidad fecundante a través de un proceso de preparación *in vitro* que tiene por objetivo la selección e inicio de la capacitación de los espermatozoides que permitirá desencadenar la reacción acrosómica y de esta manera los espermatozoides

adquieran la capacidad para atravesar la zona pelúcida del ovocito (Palma, 2001; citado por Mango, 2015).

#### **2.4.2 Cultivo de embriones**

El cultivo embrionario es el último y más prolongado paso en el proceso de producción *in vitro* de embriones. Corresponde, además, al periodo en el que se establece el mayor porcentaje de pérdidas del sistema (Mucci *et al.*, 2006).

Entre los posibles factores responsables de las altas tasas de pérdida, las condiciones de cultivo, como osmolaridad, pH, gases presentes en la incubadora, temperatura y tiempo, así como los componentes presentes en el medio de cultivo, influyen significativamente el desarrollo embrionario, determinando los cambios responsables de su menor calidad, comparados con los embriones producidos *in vivo* (Mucci *et al.*, 2006).

### III. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

#### 3.1 Hipótesis

**H0:** La suplementación del medio de maduración *in vitro* con fluido folicular (FF) de alpaca no mejora las tasas de maduración de los ovocitos de *Vicugna pacos*.

**H1:** La suplementación del medio de maduración *in vitro* con FF de alpaca mejora las tasas de maduración de los ovocitos de *Vicugna pacos*.

#### 3.2 Objetivos

##### 3.2.1 Objetivo General

Evaluar el efecto del fluido folicular de alpaca como suplemento en el medio de maduración *in vitro* en ovocitos de *Vicugna pacos*.

##### 3.2.2 Objetivos Específicos

- Comparar las tasas de maduración *in vitro* de ovocitos entre medios suplementados con fluido folicular (FF), suero fetal bovino (SFB) y suero fetal bovino + fluido folicular (SFB+FF).
- Comparar las tasas de expansión de las células del cumulus, producción de embriones y degradación en los ovocitos entre medios suplementados con FF, SFB y SFB+FF.
- Evaluar el efecto del tiempo y la temperatura a la que fueron sometidos los ovarios previo a los protocolos de maduración sobre las tasas de maduración *in vitro*, producción de embriones y degradación de los ovocitos.
- Comparar las tasas de recuperación de CCO morfológicamente normales (clases I y II) entre los métodos de aspiración y cortes de los ovarios.

## **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **4.1 Lugar de estudio**

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Fisiología Animal de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Lima-Perú, durante los meses de mayo a octubre del año 2018.

### **4.2 Materiales**

#### **4.2.1 Material biológico**

El material biológico (ovarios y testículos de alpaca de la raza Huacaya) empleado para el presente trabajo fue obtenido del camal municipal de la ciudad de Huancavelica, región Huancavelica, Perú (4050 msnm, temperatura promedio anual 8 °C – 10 °C), utilizándose un total de 412 ovarios y 4 epidídimos.

#### **4.2.2 Medios de Cultivo y Reactivos**

- **Transporte**

Para el transporte de los ovarios y testículos se empleó solución salina al 0.9%, la cual se mantuvo a 4 °C mediante el uso de gel-packs y una caja termo-aislante.

- **Lavado de las muestras biológicas**

BFS suplementado con antibióticos: Cloruro de sodio (Sigma S5886), cloruro de potasio (P9333 Sigma), fosfato de potasio (P5379 Sigma) y fosfato dibásico de sodio (Sigma S5136), suplementado con penicilina sódica (P3032 Sigma) y estreptomicina (S1277 Sigma).

- **Lavado de los CCO**

Para el lavado y selección de los CCO morfológicamente normales (clases I y II) se empleó una solución Dulbecco (D5773 Sigma) suplementada con cloruro de calcio (C1016 Sigma), penicilina sódica (P3032 Sigma), estreptomicina (S1277 Sigma) y heparina sódica (laboratorio Sanderson 5000UI/mL).

- **Medio de maduración *in vitro***

El medio de maduración tuvo como base el medio 199 (M2520 Sigma), diluido en agua ultra pura de calidad Milli-Q® y suplementado FSH (Folltropin-V), eCG (Novormon), estradiol 17 $\beta$  (E4389 Sigma), piruvato de sodio (P5280 Sigma), factor de crecimiento epidérmico (ECG) (E9644 Sigma), albúmina bovina sérica fracción V (BSA) (A3311 Sigma), y gentamicina (G3632 Sigma) y suero fetal bovino (SFB) (F4135 Sigma).

- **Aislamiento de espermatozoides**

Para el manejo de los espermatozoides se empleó el medio HAM F-10 (N6635 Sigma), suplementado con lactato de calcio (L4388 Sigma), bicarbonato de sodio (S5761 Sigma), penicilina y estreptomina.

- **FIV y cultivo de embriones**

Para la fertilización *in vitro* se utilizó el medio Ham-F10 (N6635 Sigma), suplementado con PHE (penicilamina (P4875 Sigma), hipotaurina (1384 Sigma) y epinefrina (E4250 Sigma), más heparina. Finalmente, para el cultivo de embriones se utilizó el medio KSOM+ aa (Merck MR-106-D) suplementado con SFB (F4135 Sigma), piruvato de sodio (P5280 Sigma) y gentamicina (G3632 Sigma).

Todos los medios de cultivo fueron filtrados mediante el uso de filtros de membrana de 0.22  $\mu$ m (Millex-GV Merck) y cubiertos con aceite mineral (LifeGuard Oil).

- **Evaluación de la vitalidad**

Azul de tripán (T6146 Sigma).

- **Evaluación del estadio nuclear en los ovocitos**

Colorante vital Hoechst 33342 (14533 Sigma) y solución BFS.

#### **4.2.3 Equipos y materiales de laboratorio**

Incubadora de CO<sub>2</sub>, cámara de flujo laminar, balanza analítica, centrífuga, microscopio de luz, estereoscopio, microscopio invertido, microscopio de fluorescencia (marca AJ

Seitz), plancha termo-controlada, estufa, autoclave, sistema de purificación de agua, refrigeradora y micropipetas.

Pipetas Pasteur de vidrio, bulbos de goma para pipetas, tips, tubos de centrífuga de 1.5, 0.6 y 0.2mL, tubos Falcon de 15mL y 50mL, filtros de membrana de 0.22  $\mu$ m, placas petri, de vidrio, placas de cultivo Falcon de 60x15mm (353652) pinzas, pinzas hemostáticas, tijeras, coladores, vasos precipitados, jeringas de 10mL, agujas 21G, hojas de bisturí, cajas de Tecnopor, gel-packs, láminas y laminillas.

### **4.3 Métodos**

#### **4.3.1 Lugar de colección y traslado de muestras biológicas (ovarios)**

Las muestras biológicas (ovarios de alpaca) fueron colectadas en el camal municipal de Huancavelica durante los meses de mayo a octubre del 2018 y transportadas en una solución de NaCl 0.9% a 4°C al Laboratorio de Fisiología de la Reproducción Facultad de Ciencias Biológicas-UNMSM (el tiempo aproximado desde el beneficio del animal hasta su llegada al laboratorio fue a las 22 horas post mortem).

#### **4.3.2 Aislamiento del fluido folicular**

El fluido folicular usado en el presente trabajo se colectó en 2 periodos diferentes de tiempo. El primer grupo de ovarios usados para el aislamiento del FF fue colectado durante los meses de enero a diciembre del 2017 y fueron almacenados a -20°C durante hasta su empleo. El segundo grupo de ovarios empleados para el mismo fin fue colectado durante los primeros días del mes de julio del 2018 y de la misma manera fueron almacenados a -20°C durante hasta su empleo.

Previo al inicio de los ensayos de maduración, los ovarios almacenados fueron descongelados para el aislamiento del fluido folicular (FF). Brevemente, los ovarios ya descongelados fueron lavados con cloruro de sodio y con una aguja N° 21G unida a una jeringa de 10ml se procedió a aspirar el fluido folicular de los folículos de entre 2-8mm de diámetro. El fluido folicular colectado fue centrifugado a 1500 rpm durante 15

minutos, luego se recuperó el sobrenadante que fue colocado en microtubos y se volvió a centrifugar esta vez a 2500 rpm durante 5 minutos. Finalmente se recuperó el sobrenadante que fue filtrado con filtros de 0.22µm de poro. El FF ya filtrado fue colocado en alícuotas y almacenado a -20°C hasta su uso.

#### **4.3.3 Aislamiento y selección de ovocitos**

Para los ensayos de maduración *in vitro* una vez en el laboratorio de fisiología de la reproducción los ovarios fueron lavados 2 veces con una solución salina tamponada con fosfato o buffer fosfato salino (BFS) más penicilina 0.075g/L y estreptomicina 0.075g/L a 38.5°C y se procedió a la disección de los tejidos adheridos a los ovarios.

##### **4.3.3.1 Aislamiento por el método de aspiración**

Luego del lavado y disección se procedió a la aspiración de los folículos de entre 2-8mm de diámetro con una aguja 21G unida a una jeringa de 10mL conteniendo solución Dulbecco más penicilina 0.075g/L y estreptomicina 0.075g/L a 38.5°C. El fluido folicular aspirado se colocó en un tubo de 15mL conteniendo solución Dulbecco más antibióticos y se mantuvo en incubadora a 38.5°C. Una vez culminada la aspiración de todos los folículos se dejó reposar durante 10 minutos, para luego con la ayuda de una pipeta recuperar el pellet formado en el fondo del tubo. El pellet recuperado fue colocado en placas conteniendo solución de Dulbecco a 38.5 °C y con la ayuda de un estereoscopio se procedió al aislamiento, selección y lavado de los CCO morfológicamente normales, según la evaluación del número y compactación de las capas de células del cumulus y la homogeneidad del citoplasma, para la maduración *in vitro* (clases I y II descrita por Sánchez *et al.*, 2003). Los CCO seleccionados fueron lavados 3 veces más en el medio de maduración, para luego ser colocados en una placa de cultivo conteniendo gotas de 50uL del medio de maduración con los suplementos correspondientes.

#### **4.3.3.2 Aislamiento por el método de cortes**

Para el aislamiento de los CCO por el método de cortes, luego de la aspiración, los ovarios fueron colocados sobre placas Petri conteniendo solución de Dulbecco a 38.5 °C y se procedió a realizar cortes superficiales sobre toda la superficie de los ovarios. Luego con la ayuda de un estereoscopio se aislaron y seleccionaron los CCO de clase I y II según Sánchez *et al.*, 2003 y se siguió el mismo procedimiento empleado para los CCO aislados por el método de aspiración.

Todos los medios de maduración empleados fueron preparados con al menos 12 horas de anticipación, cubiertos con aceite mineral y mantenidos en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 38.5 °C para la estabilización del pH y la temperatura hasta su uso.

#### **4.3.3.3 Selección de los CCO para cultivo en medio de maduración**

Para la selección de los CCO se usó como referencia la clasificación morfológica de los descrita por Torres en el 2017. En base a estas características los CCOs aislados fueron clasificados dentro alguna de las categorías correspondientes (ver anexos, Figura 14).

- **Clase 1**

CCO con más de 5 capas completas de células del cumulus que rodean completamente al ovocito y citoplasma oscuro homogéneo.

- **Clase 2**

CCO con menos de 5 capas de células del cumulus completas y con citoplasma oscuro homogéneo.

- **Clase 3**

CCO con capas de células del cumulus presentes, pero menos compactas y citoplasma no homogéneo



- **Clase 4**

Ovocito con citoplasma heterogéneo o fragmentado y con las células del cumulus disgregadas o ausentes en su totalidad.

#### **4.3.4 Evaluación de la vitalidad de los CCO**

Para la evaluación de este parámetro se utilizaron CCO que no entraron al cultivo *in vitro*. Los que fueron mantenidos a 38.5 °C en solución de Dulbecco hasta su evaluación. Para determinar la vitalidad se procedió a aislar los CCO restantes y colocarlos en gotas conteniendo solución de tripán al 0.4%, diluido en BFS y mantenida a 38.5 °C. Se consideraron como CCO vivos aquellos que no adquirieron ninguna tinción tras la exposición al colorante vital azul de tripán, mientras que se consideraron muertos los CCO que tomaron una coloración azul oscuro tras la exposición.

#### **4.3.5 Cultivo en medio de maduración**

El medio de maduración estuvo compuesto por medio 199 suplementado con FSH 1.5uL/mL, eCG 10UI/mL, estradiol 17 $\beta$  0.1 $\mu$ L/mL, factor de crecimiento epidérmico (FCE) 50ng/mL, piruvato sódico 0.2mM, albúmina bovina sérica (BSA) 4mg/mL, suero fetal Bovino (10%) y gentamicina 50 $\mu$ g/mL. Además, se evaluaron 3 suplementos para el medio de maduración: suero fetal bovino (SFB) al 10%, fluido folicular (FF) al 10% y suero fetal bovino + fluido folicular (SFB+FF) ambos al 10%.

Los CCO seleccionados para cultivo, luego de ser lavados, fueron colocados aleatoriamente en placas de cultivo conteniendo gotas de 50 $\mu$ L del medio de maduración con los suplementos correspondientes (SFB, FF o SFB+FF) y en grupos de 10-12 CCO por gota. El cultivo se realizó a 38.5 °C 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa durante 32 a 36 horas.

#### **4.3.6 Evaluación de la maduración de ovocito**

Transcurrido el periodo de cultivo los CCO fueron lavados en solución Dulbecco mantenida a 38.5 °C. Las células del cumulus que aún se mantenían adheridas a la superficie del ovocito fueron desprendidas mecánicamente (denudación) mediante aspiraciones y espiraciones suaves por medio de una pipeta Pasteur (pipeteo). La maduración de los ovocitos se evaluó por la constatación de la presencia del 1º cuerpo polar observada al microscopio de luz invertido y mediante microscopía de fluorescencia.

#### **4.3.7 Evaluación del estadio nuclear de los ovocitos y de la presencia de ADN fragmentado**

Luego de la evaluación de la madurez, tanto los ovocitos catalogados maduros como inmaduros fueron evaluados por medio de microscopía de fluorescencia para determinar el estadio de la meiosis presente. Para la tinción del ADN los ovocitos denudados fueron expuestos a una solución de BFS-Hoechst 33342 a una concentración de 5µg/mL durante 15-30 minutos cubiertos de la luz. Transcurrido este tiempo los ovocitos fueron evaluados mediante el uso de un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación UV y una longitud de onda de emisión de 461nm a un aumento de 250X.

Los estadios de la meiosis fueron identificados por medio de la evaluación del grado de condensación de la cromatina presente en cada uno de los ovocitos. Los estadios de vesícula germinal y metafase I fueron considerados inmaduros, mientras que aquellos en el estadio metafase II determinada por la presencia del primer cuerpo polar y/o la placa metafásica fueron considerados como maduros. Finalmente, los ovocitos que presentaron regiones fragmentadas de ADN teñido fueron catalogadas como ovocitos degradados.

#### 4.3.8 Selección espermática por la técnica de swim-up

Los testículos fueron lavados con BFS suplementado con penicilina (0.075g/L) y estreptomicina (0.075g/L). La zona caudal de los epidídimos fue disectada y separada de cada testículo y se limpió hasta que los epidídimos quedaran libres de tejido adiposo y vasos sanguíneos. Una vez limpios los epidídimos fueron cortados en trozos pequeños y lavados con 500µL de medio HAM a 38.5 °C y se dejó reposar la suspensión por 5 minutos. Transcurrido el tiempo se recuperó el sobrenadante y se procedió a centrifugarlo a 1600rpm por 6 minutos a 38.5 °C. Terminada la centrifugación se descartó el sobrenadante y el pellet fue resuspendido en 500 µL medio HAM suplementado con 15mg/mL de BSA, el tubo de centrífuga conteniendo la suspensión se dejó en incubación (inclinando el tubo 45º grados) durante 60 minutos en una incubadora de CO<sub>2</sub> a 38.5 °C. Pasado este tiempo se recuperó 200µL de la región media de la suspensión y se procedió a evaluar la concentración y movilidad de los espermatozoides.

#### 4.3.9 FIV

Se realizaron 4 ensayos de fertilización *in vitro*, empleando ovocitos maduros y espermatozoides aislados de la región caudal de epidídimo y seleccionados por el método de swim-up.

Transcurrido el tiempo de maduración los ovocitos fueron lavados en medio de fecundación y mantenidos en el mismo a 38.5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa hasta el momento de la fecundación. La FIV se realizó en microgotas de 50µL de medio HAM-F10, conteniendo una concentración final de 2 millones de espermatozoides por mililitro, suplementado con PHE (Penicilamina 2mM, Hipotaurina 1mM y Epinefrina 250µM) y 10µL/mL de heparina, empleados como agentes capacitantes. Se colocaron entre 10-15 ovocitos maduros por cada microgota y se cubrió la placa de cultivo con aceite mineral. Los ovocitos junto con los

espermatozoides fueron incubados a 38.5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa durante 18 horas.

#### **4.3.10 Cultivo de embriones**

Transcurridas las 18 horas se separaron los espermatozoides adheridos a la superficie de los presuntos cigotos mediante pipeteo continuo y se lavaron con el medio de cultivo de embriones a 38.5 °C. Luego del lavado se colocaron de 10 a 12 presuntos cigotos por gota en placas de 35x10mm conteniendo gotas de 25 µL con medio KSOM suplementado con SFB 10%, piruvato sódico 2mM y gentamicina 50 µg/mL (medio de cultivo de embriones), y se cubrieron con aceite mineral. Los presuntos cigotos fueron cultivados a 38.5 °C, 5% de CO<sub>2</sub> y 100% de humedad relativa durante 7 días.

#### **4.3.11 Valoración del desarrollo embrionario**

En los días 3º, 5º y 7º del inicio del cultivo, se procedió a valorar el desarrollo embrionario alcanzado mediante la tinción con el colorante fluorescente Hoechst 33342. Los presuntos embriones fueron expuestos a una solución de BFS-Hoechst a una concentración de 5µg/mL durante 15-30 minutos cubiertos de la luz. Transcurrido este tiempo fueron evaluados mediante el uso de un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación UV y una longitud de onda de emisión de 461nm a un aumento de 250X para su clasificación de acuerdo al número total de células embrionarias presentes. Los embriones fueron clasificados como:

- Embrión de 2 células
- Embrión de 4 células
- Embrión de 8 células
- Mórula (más de 16 células).

No se observaron blastocistos

#### **4.3.12 Análisis estadístico**

Se analizaron las variables cantidad de CCO aislados por ensayo y por ovario, expansión de las células de cumulus, maduración de los ovocitos, presencia de los estadios de vesícula germinal y metafase I, degradación de los ovocitos y producción de embriones. Para los análisis estadísticos se usó el software SPSS v.23. La determinación de la normalidad de los datos evaluados fue realizada mediante la prueba Shapiro-Wilk. Asimismo, se realizaron comparaciones entre las medias de los grupos utilizando el estadístico ANOVA cuando las muestras presentaron una distribución normal y la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis cuando las variables no mostraron una distribución normal. Los valores  $p < 0.05$  fueron considerados como estadísticamente significativos.

## V. RESULTADOS

### 5.1. Promedio de CCO aislados y vitalidad

Para el desarrollo del presente trabajo de investigación se emplearon un total de 412 ovarios obtenidos en 16 experimentos de maduración *in vitro*. En la tabla 1 se observa que el promedio de CCO, morfológicamente adecuados para la maduración *in vitro*, (clases I y II según Torres, 2017) aislados fue de 63.5 CCO por envío, mientras que el promedio por ovario fue de 2.7. Además, se evaluó la vitalidad de los CCO por medio de la tinción con el colorante vital azul de tripán encontrándose en promedio un 32.6% de ovocitos vivos por envío.

**Tabla 01.** Promedio de ovocitos aislados por ovario y vitalidad de los ovocitos.

Nº de ovarios (n)	Características evaluadas Promedio (%) $\pm$ DE		
	Promedio de CCO	Promedio de CCO	Vitalidad
	Clases I y II aislados	clases I y II aislados	
	por ensayo	por ovario	
412	63.5 $\pm$ 29.8	2.7 $\pm$ 1.1	32.6 $\pm$ 14.8

CCO: Complejo cumulus-ovocito; DE: desviación estándar.

### 5.2 Comparación de 2 métodos de aislamiento de los CCO (por aspirado y por cortes)

La tabla 2 muestra los resultados obtenidos al evaluar la cantidad total de CCO clases I y II aislados por medio del método de aspirado de los folículos vs el aislamiento por el método de cortes, así como la comparación del promedio de los CCO clases I y II obtenidos por ovario. Se observa que en promedio se lograron aislar 52.6 CCO por el método de aspirado, mientras que por el método de cortes se lograron aislar en promedio 34.9 CCO por experimento. Por otra parte, al comparar el promedio de CCO aislados por cada ovario trabajado se observa que el promedio obtenido por el método de aspirado es de 2.1 CCO por ovario, mientras que por el método de cortes se

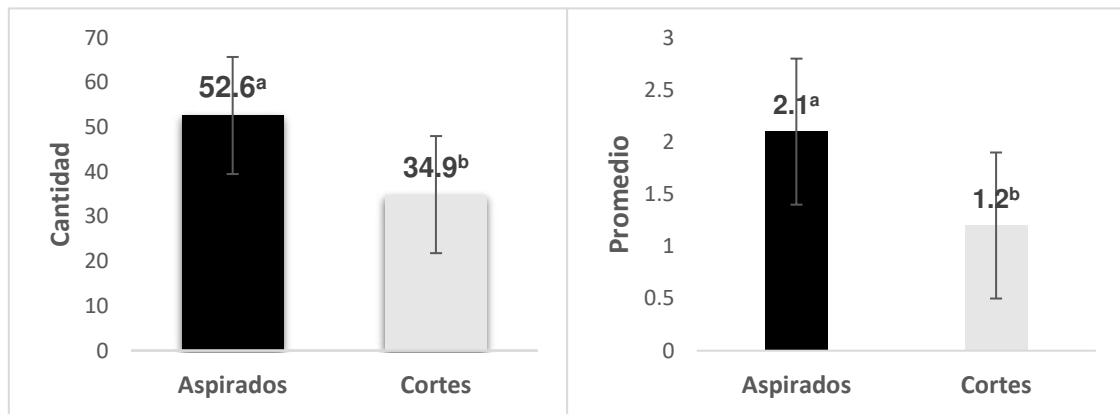
obtuvo en promedio 1.2 CCO por ovario. Al análisis estadístico se observó diferencia significativa ( $p<0.05$ ) al comparar ambos métodos de aislamiento tanto para el número de CCO clases I y II aislados por envío como para el promedio aislado por ovario.

**Tabla 02.** Comparación de los métodos de recuperación de los CCOs sobre la cantidad de CCO clases I y II aislados por envío y por ovocito

Método	Ovocitos <b>clases I y II</b> aislados (%)		
	n	Cantidad de CCO clases I y II	Promedio de CCO clases I y II
		aislados por experimento	aislados por ovario
<b>Aspirados</b>	412	52.6±17.8 <sup>a</sup>	2.1±0.8 <sup>a</sup>
<b>Cortes</b>	255	34.9 ±13.1 <sup>b</sup>	1.2±0.7 <sup>b</sup>

Los valores en la misma columna y con letra distinta (a, b) presentan diferencia significativa ( $p<0.05$ ); n: indica el número de ovarios empleados.

**Figura 04.** Comparación de la cantidad y promedio de CCO clases I y II aislados



Cantidad de CCO clases I y II aislados por

Promedio de CCO clases I y II aislados por

mediante los métodos de aspiración vs cortes.

\* Se observa diferencia significativa entre las técnicas evaluadas ( $p<0.05$ ).

### 5.3 Efecto de la suplementación con SFB, FF y SFB+FF en los medios de maduración *in vitro* sobre los porcentajes de expansión de las células del cumulus y maduración en CCO aislados por el método de aspirado

La tabla 3 muestra los resultados de comparar los 3 suplementos usados en el medio de maduración *in vitro*: suero fetal bovino (SFB), fluido folicular (FF) y SFB + FF sobre los porcentajes de expansión de las células del cumulus y maduración (evaluado por constatación de la presencia de primer cuerpo polar) en CCO aislados por el método de aspirado y sometidos a un protocolo de maduración *in vitro* por 32 a 36 horas. Se observa un promedio de expansión de las células del cumulus de 69.3% para los CCO incubados en medio de maduración suplementado solo con SFB, mientras que para los CCO incubados en medio suplementado solo con FF se obtuvo un porcentaje de 78.7%, y para los CCO incubados en un medio suplementado tanto con SFB como con FF se encontró un 67.4% de CCO con expansión de las células del cumulus al término del periodo de incubación. Al análisis estadístico no se encontró diferencia significativa entre los grupos evaluados ( $p>0.05$ ). Sin embargo, se observa un mayor porcentaje de expansión de las células del cumulus para los CCO incubados en el medio suplementado solo con FF en comparación con los otros 2 tratamientos.

**Tabla 03.** Porcentajes de maduración y expansión de las células del cumulus para los ovocitos obtenidos por el método de aspiración post-32 a 36 horas de cultivo en el medio de maduración con los suplementos correspondientes

Suplementos	Características evaluadas (%)		
	n	Ovocitos con células de cumulus expandidas	Ovocitos con presencia de cuerpo polar
<b>SFB</b>	295	69.3±27.5 <sup>a</sup>	25.5±13.8 <sup>a</sup>
<b>FF</b>	138	78.7±17.5 <sup>a</sup>	24.7±11.8 <sup>a</sup>
<b>SFB+FF</b>	361	67.4±8.0 <sup>a</sup>	19.2±12.9 <sup>a</sup>



*Los valores en la misma columna y con la misma letra no presentan diferencia significativa ( $p>0.05$ ). n: número de CCO empleados.*

Así mismo, en la tabla 3 también muestra el efecto de los 3 suplementos sobre la maduración de los ovocitos. Se observa un promedio de maduración de los ovocitos de 25% para los CCO incubados en medio suplementado solo con SFB, mientras que para los medios suplementados con FF y SFB+FF se observa promedios de 24.7% y 19.2% respectivamente. De la misma manera que en el caso anterior no se observó diferencia significativa ( $p>0.05$ ) entre los tratamientos evaluados. Sin embargo, puede observarse un menor porcentaje de maduración para los ovocitos incubados en el medio suplementado con SFB+FF en comparación con los porcentajes obtenidos cuando se usaron los suplementos por separado.

#### **5.4 Efecto de la suplementación de los medios de maduración *in vitro* con SFB, FF y SFB+FF sobre los porcentajes de expansión de las células del cumulus y maduración en CCO aislados por el método de cortes**

La tabla 4 muestra los resultados de la comparación del efecto de los 3 suplementos usados sobre la expansión de las células del cumulus y la maduración nuclear en CCO aislados por el método de cortes y sometidos a un protocolo de maduración *in vitro* bajo las mismas condiciones que para el caso anterior. Se observa un promedio de expansión de las células del cumulus de 63.4% para los CCO incubados en medio de maduración suplementado solo con SFB, mientras que para el caso de los CCO incubados en medio suplementado solo con FF se obtuvo un porcentaje de 77.9% y para los CCO incubados en un medio suplementado tanto con SFB como con FF se encontró un porcentaje de 61.9%. El análisis estadístico no mostró diferencia significativa entre los grupos evaluados ( $p>0.05$ ). Si embargo, al igual que para el caso de los CCO aislados por aspirado, se observa un mayor porcentaje de expansión

de las células del cumulus para los CCO incubados en el medio suplementado solo con FF (77.9%).

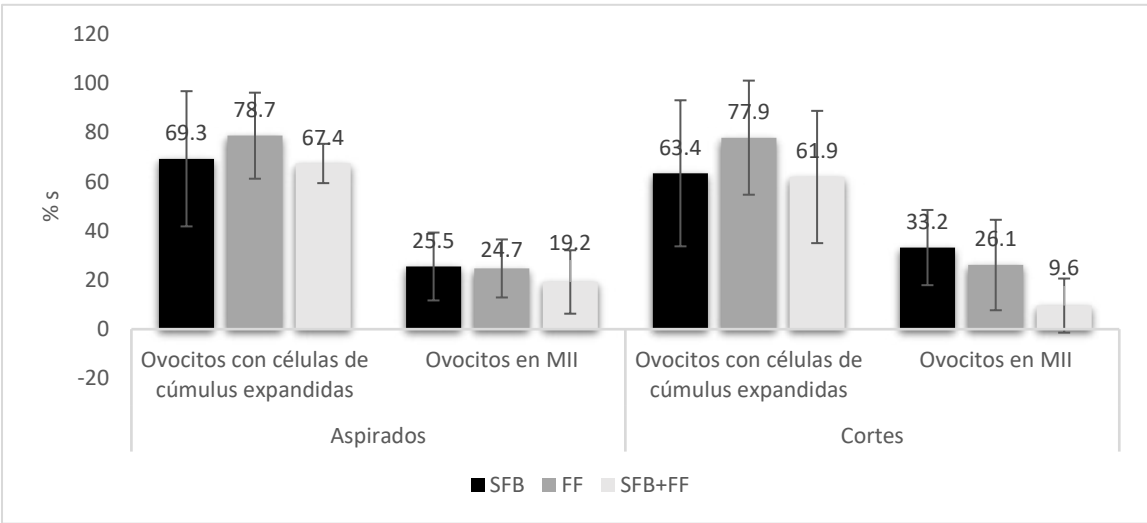
**Tabla 04.** Porcentajes de maduración y expansión de las células del cumulus para los ovocitos obtenidos por el método de cortes post-32 a 36 horas de cultivo en el medio de maduración con los suplementos correspondientes

Suplementos	n	Características evaluadas (%)	
		Ovocitos con células de cumulus expandidas	Ovocitos con presencia de cuerpo polar
<b>SFB</b>	68	63.4±29.7 <sup>a</sup>	33.2±15.3 <sup>a</sup>
<b>FF</b>	62	77.9±23.2 <sup>a</sup>	26.1±18.4 <sup>a</sup>
<b>SFB+FF</b>	60	61.9±26.9 <sup>a</sup>	9.6±11.0 <sup>a</sup>

*Los valores en la misma columna y con la misma letra no presentan diferencia significativa ( $p>0.05$ ). n: número de CCO empleados.*

Con respecto al efecto sobre la maduración de los ovocitos la tabla 4 muestra un promedio de maduración de 33.2% para los CCO incubados en medio suplementado solo con SFB, mientras que para los medios suplementados con FF y SFB+FF se observa promedios de 26.1 y 9.6% respectivamente. No se encontró diferencia significativa ( $p>0.05$ ) entre los tratamientos evaluados, sin embargo, se observa una marcada disminución en el porcentaje de maduración para los ovocitos incubados en el medio suplementado con SFB+FF (9.6%).

**Figura 05.** Porcentajes de maduración y expansión de las células del cumulus obtenidos en los 3 medios de maduración suplementados



**5.5 Efecto de la suplementación de los medios de maduración *in vitro* con SFB, FF y SFBFF sobre el estadio nuclear de los ovocitos inmaduros y la presencia de ADN fragmentado**

La tabla 5 y la figura 6 muestran los resultados referentes a los estadios nucleares presentes en los ovocitos madurados en presencia de los suplementos evaluados. Para el grupo de ovocitos aislados por el método de aspiración, no se encontró diferencia significativa ( $p>0.05$ ) entre los porcentajes hallados para los estadios de vesícula germinal (34.5%, 22.4% y 22.3%) para los medios suplementados con SFB, FF y SFB+FF respectivamente) y metafase I (13.1%, 13.1% y 4.3% para SFB, FF y SFB+FF respectivamente).

Para los ovocitos aislados por cortes, por otro lado, se encontró para el medio suplementado con SFB un porcentaje (13.7%) significativamente menor ( $p<0.05$ ) de ovocitos en el estadio de VG, en comparación con los ovocitos en el mismo estadio y madurados el medio suplementado con SFB+FF (31.8%), mientras que para los

ovocitos en metafase I no se encontró diferencia significativa ( $p>0.05$ ) en los porcentajes hallados entre los 3 evaluados.

**Tabla 05.** Estadío nuclear y presencia de ADN fragmentado en los ovocitos inmaduros post cultivo en presencia de los suplementos correspondientes

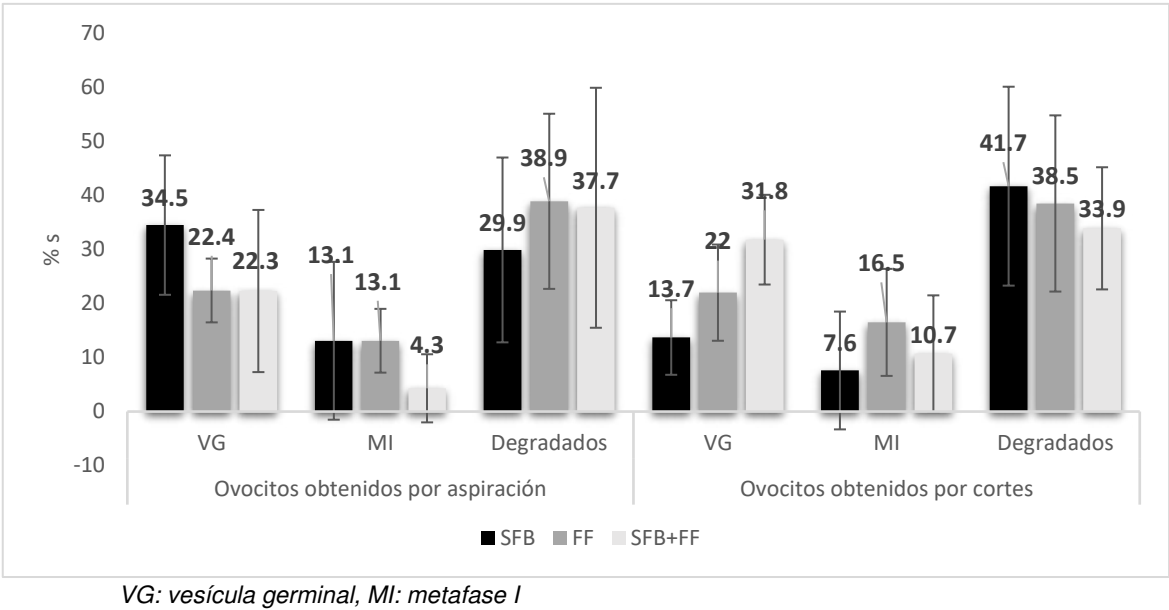
	Estadío nuclear (%)							
	Ovocitos recuperados por aspiración				Ovocitos recuperados por cortes			
	n	VG	MI	Ovocitos degradados	n	VG	MI	Ovocitos degradados
SFB	76	34.5±12.9 <sup>a</sup>	13.1±14.6 <sup>a</sup>	29.9±17.1 <sup>a</sup>	57	13.7±6.9 <sup>a</sup>	7.6±10.9 <sup>a</sup>	41.7±18.4 <sup>a</sup>
FF	81	22.4±5.9 <sup>a</sup>	13.1±5.9 <sup>a</sup>	38.9±16.2 <sup>a</sup>	43	22.0±8.9	16.5±9.9 <sup>a</sup>	38.5±16.3 <sup>a</sup>
SFB+FF	86	22.3±15.0 <sup>a</sup>	4.3±6.3 <sup>a</sup>	37.7±22.2 <sup>a</sup>	51	31.8±8.3 <sup>b</sup>	10.7±10.8 <sup>a</sup>	33.9±11.3 <sup>a</sup>

VG: vesícula germinal, MI: metafase I. Los valores en la misma columna y con letra distinta (a, b)

presentan diferencia significativa ( $p<0.05$ ); n: número de ovocitos empleados.

Asimismo, se muestran los resultados con respecto al porcentaje de ovocitos degradados (con presencia de ADN fragmentado) luego de haber sido sometidos al protocolo de maduración *in vitro* no encontrándose diferencia significativa ( $p>0.05$ ) entre ninguno de medios con los 3 suplementos tanto para los ovocitos aislados por aspiración como por cortes.

**Figura 06.** Estadío nuclear y presencia de ADN fragmentado en los ovocitos inmaduros post cultivo en presencia de los suplementos correspondientes



**5.6 Efecto de la suplementación del medio de maduración con SFB, FF y SFB+FF sobre el porcentaje de producción de embriones post FIV**

Para el análisis de la producción de embriones, dado que el número de embriones totales fue pequeño, se analizaron en conjunto los datos obtenidos por medio de los 2 métodos de aislamiento de CCO empleados (aspiración + cortes).

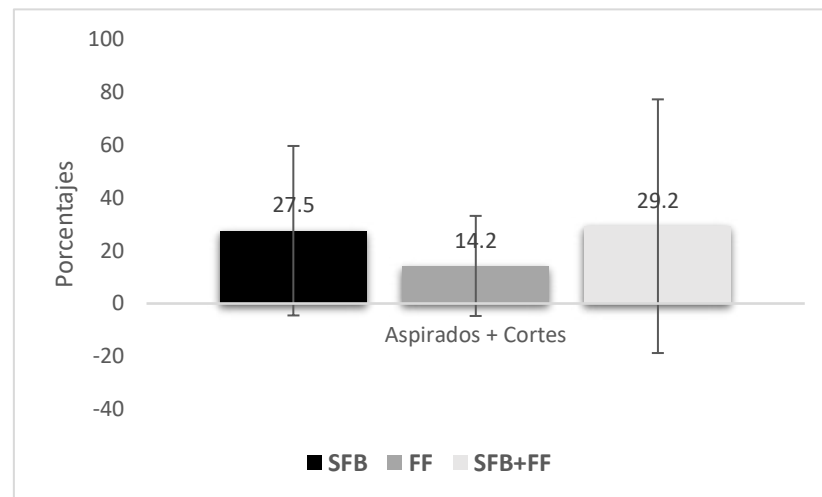
La tabla 6 y la figura 7 muestran los porcentajes de producción de embriones, de los ovocitos madurados en presencia de los suplementos empleados y sometidos a un protocolo de fertilización *in vitro* (FIV). Para los ovocitos madurados en presencia de SFB un promedio de 27.5% de producción embrionaria, mientras que para los ovocitos madurados en presencia de FF y SFB+FF se obtuvieron tasas de producción embrionaria de 14.2% y 29.2% respectivamente, no encontrándose diferencia significativa ( $p>0.05$ ) entre los grupos evaluados; sin embargo, se observa una tendencia a una menor producción de embriones para los ovocitos madurados en el medio suplementado solo con FF.

**Tabla 06.** Comparación de los porcentajes de producción de embriones entre los suplementos usados

Suplementos	n	Producción embrionaria (%)
		Ovocitos recuperados por Aspirados + cortes
<b>SFB</b>	20	27.5±32.0 <sup>a</sup>
<b>FF</b>	20	14.2±18.9 <sup>a</sup>
<b>SFB+FF</b>	12	29.2±47.9 <sup>a</sup>

Los valores en la misma columna y con la misma letra no presentan diferencia significativa ( $p>0.05$ ). n: número de ovocitos maduros empleados.

**Figura 07.** Porcentajes de producción de embriones para los ovocitos madurados en presencia de los suplementos usados



### 5.7 Comparación de los porcentajes de maduración y degradación de los ovocitos (evaluado por la presencia de ADN fragmentado) encontrados entre los grupos de CCO aislados por los métodos de aspiración y cortes

Para el análisis de la influencia del método del aislamiento de los CCO sobre las tasas de maduración y degradación de los ovocitos luego del cultivo, se evaluaron los datos conjuntos de los 3 suplementos (SFB, FF y SFB+FF) diferenciándolos solo por el método de aislamiento.

Con respecto a la maduración de los ovocitos la tabla 7 y la figura 8 muestran un porcentaje promedio de 22.9% de maduración para los ovocitos recuperados por aspiración, mientras que para los recuperados por cortes se obtuvo un promedio de maduración de 22.8%, no encontrándose diferencia significativa ( $p>0.05$ ) para ninguno de las características evaluadas.

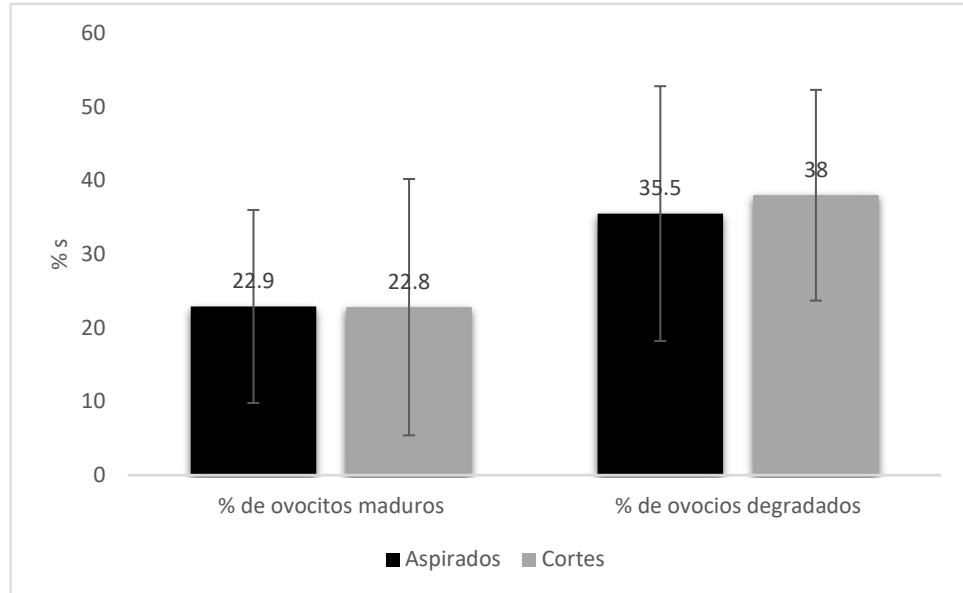
**Tabla 07.** Comparación de los porcentajes de maduración y degradación de los ovocitos (evaluado por la presencia de ADN fragmentado) encontrados entre los grupos de CCO aislados por los métodos de aspiración y cortes

<b>Características evaluadas (%)</b>				
<b>Método</b>	<b>n</b>	<b>% de ovocitos maduros</b>	<b>n</b>	<b>% de ovocitos degradados</b>
<b>Aspirados</b>	794	22.9±13.1 <sup>a</sup>	243	35.5±17.4 <sup>a</sup>
<b>Cortes</b>	190	22.8±17.3 <sup>a</sup>	151	38.0±14.3 <sup>a</sup>

*Los valores en la misma columna y con la misma letra no presentan diferencia significativa ( $p>0.05$ ). n: número de ovocitos empleados.*

Por otro lado, al evaluar los porcentajes de ovocitos con presencia de ADN fragmentado luego del cultivo, para el grupo de ovocitos recuperados por el método de aspirado se observó un 35.5% de ovocitos degradados, mientras que para el método de cortes se registró un 38% de ovocitos con presencia de ADN fragmentado. De manera similar al caso anterior al análisis estadístico no se mostró diferencia significativa entre los grupos evaluados ( $p>0.05$ ).

**Figura 08.** Comparación de los porcentajes de maduración y presencia de ADN fragmentado entre los ovocitos recuperados por los diferentes métodos de aislamiento de CCO.



### 5.8 Efecto de la suplementación del medio de maduración con SFB, FF y SFB+FF sobre el porcentaje de producción de embriones por partenogénesis espontánea

Se registró activación por partenogénesis espontánea luego de un cultivo prolongado (120 horas aproximadamente) de los ovocitos en los medios de maduración empleados. En total se obtuvo un porcentaje de 22.7% de ovocitos activados espontáneamente (10/44).

La tabla 8 y figura 9 muestran los resultados de la comparación de los porcentajes de embriones producidos por partenogénesis espontánea presentados en los medios con los suplementos evaluados. Se observó porcentajes de 23.6%, 25% y 18.3% para los ovocitos madurados en presencia de SFB, FF y SFB+FF respectivamente, no se encontrándose diferencia significativa entre ninguno de los grupos evaluados.

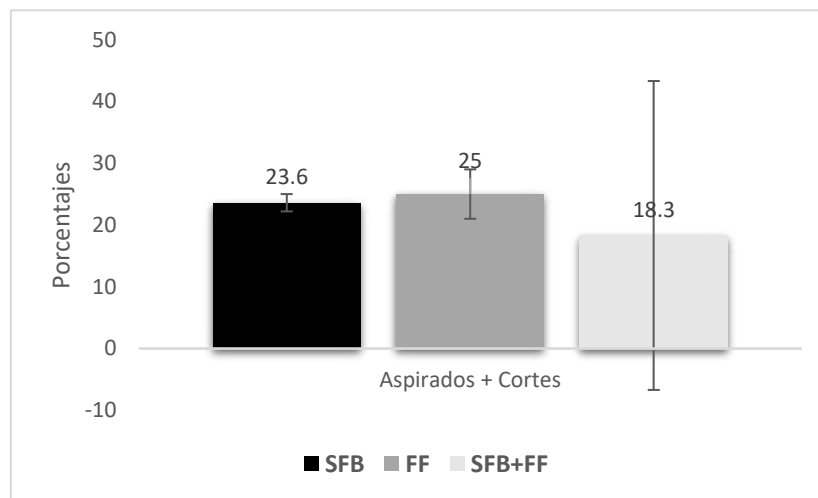


**Tabla 08.** Comparación de los porcentajes de embriones producidos por partenogénesis espontánea

Suplementos	n	Embriones producidos por partenogénesis espontánea
		Ovocitos recuperados por Aspirados + cortes
<b>SFB</b>	17	23.6±1.4 <sup>a</sup>
<b>FF</b>	16	25.0±4.0 <sup>a</sup>
<b>SFB+FF</b>	11	18.3±25 <sup>a</sup>

Los valores en la misma columna y con la misma letra no presentan diferencia significativa ( $p>0.05$ ). n: número de ovocitos empleados.

**Figura 09.** Porcentajes de embriones producidos por partenogénesis espontánea en los medios con los suplementos evaluados



## VI. DISCUSIÓN

### 6.1 Efecto de la suplementación de los medios de maduración *in vitro* con SFB, FF Y SFB+FF sobre los porcentajes de expansión de las células del cumulus, maduración y producción de embriones

Si bien actualmente la maduración *in vitro* de ovocitos forma parte de los protocolos de reproducción asistida aplicadas a diversas especies, la efectividad de esta técnica para muchas especies es aún baja. Esto podría deberse a deficiencias en los medios de cultivo usados (Combelles, *et al.*, 2002).

Varios estudios han documentado los beneficios de la suplementación de los medios de maduración *in vitro* con SFB en las tasas de maduración y desarrollo de los ovocitos. Aunque su composición aún no se conoce completamente, entre los componentes del suero que beneficiarían los sistemas de maduración se incluyen proteínas, hormonas y factores de crecimiento (Holzer *et al.*, 2007; Leisinger *et al.*, 2014).

Por otro lado, estudios en porcino y bovino reportan que la suplementación de los medios con fluido folicular puede promover la maduración y/o la fertilización de los ovocitos y su posterior desarrollo embrionario (Algriany, *et al.*, 2000; Tatemoto *et al.*, 2004; Agung *et al.*, 2010). Sin embargo, cabe mencionar, que la mayoría de dichos estudios han sido realizados con medios en presencia de suero u hormonas, por lo que los resultados obtenidos no reflejarían necesariamente el efecto del FF, el cual podría estar enmascarado por la acción de estos otros componentes (Algriany *et al.*, 2000).

En el presente trabajo se comparó el efecto del FF sobre las tasas expansión de las células del cumulus, maduración *in vitro* de ovocitos y producción de embriones en comparación con un medio suplementado con SFB y con ambos suplementos (SFB+FF). No se encontró diferencia significativa ( $p>0.05$ ) en los parámetros

evaluados tras la suplementación del medio con FF en comparación los otros suplementos usados (SFB y SFB+FF) (Tabla 4, Figura 5). Estos resultados indicarían que la acción del FF sobre las tasas de expansión de las células del cumulus, maduración y posterior desarrollo de los ovocitos es comparable al efecto del SFB. Sin embargo, si bien los efectos de FF y del SFB se evaluaron por separado, los medios empleados también estuvieron suplementados con hormonas y factores de crecimiento para todos los casos, hecho que podría dejar en duda si es que los resultados obtenidos tendrían mayor relación con el efecto real tanto del SFB como del FF o son producto del mencionado enmascaramiento derivado de las hormonas y factores de crecimiento presentes en el medio.

A este respecto, estudios en la maduración de ovocitos de alpacas en presencia de SFB como suplemento en el medio de maduración con FSH (15ng/μL), LH (1μg/μL), estradiol 17β (0.1μg/μL), factor de crecimiento epidérmico (50ng/μL) y cisteamina 10mM, encontraron mayores porcentajes de maduración cuando el medio contenía SFB (57.6%) en comparación con el medio sin SFB (18.2% (Leisinger *et al.*, 2014). Este resultado evidenciaría que existe una acción beneficiosa del SFB adicional a la conferida por las hormonas y factores de crecimiento (y no debido a un enmascaramiento de los mismos). Por lo que, en base a nuestros resultados que reportan una acción del FF comparable a la del SFB (25.5% y 24.7% de maduración para los medios suplementados con SFB y FF respectivamente), es posible inferir que el FF al igual que el SFB también confiere un beneficio adicional a los sistemas de maduración *in vitro* de ovocitos.

En relación a los porcentajes de expansión de las células del cumulus, si bien al igual que para los otros parámetros ya mencionados, no se encontró diferencia significativa ( $p>0.05$ ), se observa una tendencia hacia mayores porcentajes de expansión de las células del cumulus para los ovocitos madurados cuando el medio fue suplementado con FF tanto para los CCO aislados por aspirado como por cortes (Figura 5, tablas 3 y

4). Este resultado está de acuerdo con los reportes previos que indican un aumento en las tasas de expansión de las células del cumulus luego de una suplementación de los medios con FF (Algriany, *et al.*, 2000, Agung *et al.*, 2010). Además, este hallazgo presentaría una relevancia particular ya que se ha reportado que esta característica tiene relación con la mejora en las tasas de fertilización y capacidad de desarrollo embrionario, llegando incluso a considerarse como un proceso crítico para el buen desempeño de dichos procesos y por ende un parámetro usado para la elección de los ovocitos que seguirán protocolos de fertilización *in vitro* (Daen, 1994, Yoshino, *et al.*, 2006).

## **6.2 Efecto de la suplementación de los medios de maduración con SFB, FF y SFB+FF sobre el estadio nuclear presente en los ovocitos inmaduros post cultivo**

La tabla 5 y figura 6 muestran los resultados de la evaluación del estadio nuclear presente en los ovocitos catalogados como inmaduros luego del cultivo. Para los ovocitos recuperados por el método de aspiración, al evaluar la presencia del estadio de vesícula germinal, no se encontró diferencia significativa entre los grupos evaluados (34.5%, 22.4% y 22.3% para SFB, FF y SFB+FF respectivamente). De la misma manera, para el estadio de metafase I, tampoco se encontró diferencia significativa entre los grupos (13.1%, 13.1% y 4.3% para SFB, FF y SFB+FF respectivamente). Por otro lado, con respecto a los ovocitos recuperados por el método de corte, los resultados mostraron diferencia significativa entre el porcentaje de ovocitos en el estadio de vesícula germinal para el grupo cultivado en presencia de SFB (13.7%) en comparación con el grupo cultivado en presencia de SFB+FF (31.8%), resultado que podría indicar una relación entre la presencia del FF en los medios de maduración y mayores tasas de ovocitos detenidos en el estadio de vesícula germinal.

En cerdo diversos estudios han reportado que la suplementación de los medios de maduración *in vitro* con FF incrementa los porcentajes de ovocitos que reactivan la meiosis, alcanzan el estadio de metafase II y presentan mejores tasas de desarrollo embrionario (Yoon, *et al.*, 2000; Algriany *et al.*, 2004, Tatemoto *et al.*, 2004; Agung *et al.*, 2010). Estos reportes se muestran contradictorios a los resultados encontrados en el presente trabajo, sin embargo, en la literatura el efecto de FF sobre los parámetros evaluados ha mostrado resultados variables, los cuales muchas veces se asocian al tamaño de los folículos de los que se obtuvo el FF. Daen *et al.* (1994), por ejemplo, reportaron que la suplementación con FF proveniente de folículos mayores de 5mm de diámetro reduce la tasa de penetración del esperma y la formación de los pronúcleos masculino y femenino en porcino. Por otro lado, Tao *et al.*, (1995), no encontraron diferencia al comparar el efecto del FF proveniente de folículos de entre 2 y 5mm sobre la maduración nuclear y la formación de blastocistos en comparación con el FF proveniente de folículos de más de 5mm de diámetro. Estos reportes reflejarían una variabilidad en el efecto del FF sobre la maduración ovocitaria y desarrollo embrionario, variaciones que pueden estar, en algunos casos, asociadas a los componentes presentes en el FF y que variarían de acuerdo al tamaño del folículo del cual se extrajo.

### **6.3 Efecto de la suplementación de los medios de maduración con SFB, FF y SFB+FF sobre los porcentajes de degradación de los ovocitos (evaluado por la presencia de ADN fragmentado) post cultivo**

El estudio del nivel de degradación presente en los ovocitos que fueron sometidos a los protocolos de maduración *in vitro* tiene gran importancia debido a que uno de los problemas centrales asociados con el uso de ovocitos inmaduros no ovulados, estaría asociado al hecho de que un buen porcentaje de los ovocitos recuperados podrían

estar bajo el proceso de apoptosis, comprometiéndose así su capacidad para el desarrollo posterior (Kane, 2003, Yuan *et al.*, 2005; Oberlender, *et al.*, 2013).

Por otro lado, la necesidad de tiempos de maduración prolongados, sobre todo en camélidos, asociado a las altas concentraciones de oxígeno (20%) usualmente usadas durante los cultivos *in vitro* resultan en un incremento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) que han sido asociadas a tasas crecientes de ovocitos degenerados post cultivo (Tatemoto *et al.*, 2004; Chileno y Cainzo, 2014).

La tabla 5, figura 6 muestran los resultados referentes a los porcentajes de ovocitos con signos de ADN fragmentado evaluados mediante Hoechst. Para el grupo recuperado por el método de aspiración se encontraron porcentajes de ADN fragmentado de 30%, 39% y 37% para SFB, FF y SFB+FF respectivamente, mientras que para el grupo recuperado por el método de cortes se encontraron porcentajes de 41.7%, 38.5% y 34% para SFB, FF y SFB+FF respectivamente. En ninguno de los casos se evidenció diferencia significativa entre los grupos.

Tatemoto *et al.* (2004) trabajando en ovocitos de cerdo, reportaron una proporción 7.2 veces mayor de la actividad de la enzima superóxido dismutasa (la cual desempeña un papel protector contra el estrés oxidativo), sobre la acción de las especies reactivas de oxígeno en el FF en comparación con la actividad presente en el SFB. En nuestros resultados, sin embargo, no se observa diferencia entre la proporción de ovocitos con signos de ADN fragmentado entre los grupos madurados en presencia y ausencia del FF. Este resultado podría sugerir que la causa principal de la degradación de los ovocitos en este estudio no estaría asociada a la acción de los ROS, sino más bien a otras causas entre las que podría tener gran relevancia la proporción de ovocitos que hubiesen ingresado al proceso de apoptosis desde antes del inicio del protocolo de maduración *in vitro*, en particular debido al tiempo prolongado (22horas) y la temperatura (4 °C) a los que fueron sometidos los ovarios desde la colecta de las muestras biológicas hasta el inicio de los protocolos de maduración. Además, estos

resultados tendrían relación con los reportes de Anguita *et al.*, (2009) que indican que para las muestras biológicas recuperadas de camales la mayoría de los CCO recuperados provendrán de folículos atrésicos y por lo tanto podrían estar afectados por algún grado de apoptosis (Anguita *et al.*, 2009).

#### **6.4 Efecto del tiempo y temperatura sobre las tasas de maduración *in vitro* y producción de embriones**

Aunque las tasas de maduración *in vitro* obtenidas en este estudio son considerablemente menores a las reportadas en la literatura para la misma o especies emparentadas (52-80%) (Ratto, *et al.*, 2005; Chileno & Cainzo, 2014; Chuquitaype, 2015; Ruiz, *et al.*, 2017 y Torres, 2017), otros autores han reportado tasas de maduración de entre 36 -33.1% (Leisinger *et al.*, 2014 y Arriaga *et al.*, 2014), las que son más cercanas a las encontradas en el presente trabajo, lo que indicaría que la capacidad de los ovocitos para alcanzar la maduración nuclear puede estar sujeta a la influencia de diversos factores.

Entre los factores que pueden afectar la capacidad de los ovocitos para su posterior desarrollo, el tiempo y la temperatura de almacenamiento del material biológico desde la colecta hasta el inicio de los protocolos de maduración *in vitro* son dos factores clave que pueden contribuir al detrimento de la calidad de ovocitos, sobre todo cuando el material biológico es obtenido de camales (Klumpp, 2004; Arriaga *et al.*, 2014). En ovarios de equinos, por ejemplo, el almacenamiento por 22-24 horas a temperaturas de entre 15-20°C previo al inicio de los protocolos de maduración *in vitro* mostró la obtención de tasas de metafase II de 38.5%, así como tasas de división meiótica y producción de blastocistos de 48.7% 7.7% respectivamente (Matsukawa, *et al.*, 2007). De manera similar en bovino se encontró que el almacenamiento de los ovarios a 4 °C por 12 y 24 horas no mostró efecto significativo en el número total de ovocitos que alcanzaron la metafase II (83 y 86% respectivamente) lograron además clivaje luego

del FIV (Solano, 1994). Estos resultados mostrarían el efecto variable de la temperatura y tiempo de almacenamiento en las tasas de maduración *in vitro* de los ovocitos.

Por otro lado, en un estudio realizado en ovarios felinos que fueron almacenados 4°C por 24, 48 y 72 horas se observó una cantidad significativamente mayor en la producción de blastocistos con los ovocitos provenientes de ovarios almacenados durante 24 horas, en comparación a con los ovocitos provenientes de periodos más prolongados de almacenamiento. Esto indicaría que en los ovocitos aislados de ovarios almacenados por periodos prolongados de tiempo se produciría una disminución de la capacidad de desarrollo posterior al FIV (Klumpp, 2004). En alpaca, los estudios acerca del impacto del tiempo y la temperatura de almacenamiento sobre los resultados de los protocolos de maduración *in vitro* y producción de embriones son escasos. Arriaga *et al* (2014), compararon el efecto del almacenamiento a 2 rangos de temperaturas distintas (12-15 °C y 22-25 °C) durante 16 horas previo al inicio del protocolo de maduración, concluyendo que los ovarios de alpaca son susceptibles al almacenamiento en temperaturas de 12-15 °C (12.2% de ovocitos que alcanzaron la metafase II) comprometiéndose, además, la competencia de los ovocitos para el desarrollo post FIV (Arriaga *et al.*, 2014). Los porcentajes de maduración encontrados en este estudio varían entre 33.2% y 9.6% (Figura 5, tablas 3 y 4), lo que indicaría que la capacidad de los ovocitos de alpaca para completar la división meiótica es susceptible al almacenamiento a bajas temperaturas durante periodos prolongados de tiempo, a pesar de esto se establece que es posible rescatar material genético desde ovarios post mortem en alpacas.

En bovino resultados similares se han asociado a cambios en la membrana lipídica de los ovocitos al exponerse a temperaturas inferiores a 20°C (Arav *et al.*, 1996 citado por Arriaga *et al.*, 2014), así como lesiones del huso meiótico y endurecimiento de la zona pelúcida que afectan directamente la fecundación (Włodarczyk *et al.*, 2009,), por lo



que dichos eventos podrían también tener relación con la susceptibilidad de los ovocitos de alpaca al almacenamiento prolongado a bajas temperaturas.

Por otro lado, al evaluar los porcentajes de clivaje obtenidos luego de protocolos de FIV (Tabla 6, figura 7) se puede apreciar que los porcentajes de producción de embriones obtenidos (30.6%, 18.6% y 33.3% para los suplementos SFB, FF y SFB+FF respectivamente) son comparables a los reportados en la literatura (Arriaga *et al.*, 2014; Chileno & Cainzo, 2014; Chuquitaype, 2015), por lo que se puede inferir que si bien hubo una disminución en la capacidad de los ovocitos para alcanzar la madurez, los ovocitos madurados bajo estas condiciones mantuvieron su competencia para el desarrollo post FIV.

### **6.5 Efecto del método de colección (aspirado vs cortes) en las tasas de recuperación de CCO morfológicamente normales (clases I y II)**

La recuperación del mayor número de CCO intactos y de buena calidad es de gran importancia para la aplicación de las técnicas de reproducción asistida, debido a su impacto positivo en los procesos de maduración *in vitro*, fertilización y desarrollo embrionario (Pawshe *et al.*, 1994; Shirazi *et al.*, 2005). Sin embargo, en las alpacas los ovarios presentan un tamaño mucho menor al de otras especies como bovino o porcino, por lo que la recuperación de los CCO presenta mayor dificultad y por ende es necesario el estudio de los mejores métodos para el aislamiento de los CCO de las clases I y II para la aplicación de las diversas técnicas de reproducción asistida.

En los resultados obtenidos de la comparación de la proporción de CCO morfológicamente normales (clases I y II) aislados mediante 2 métodos (aspiración y cortes) se observa una proporción significativamente mayor de CCO aislados por el método de aspirado en comparación con el método de cortes ( $p < 0.05$ ) tanto para el número total de CCO aislados por experimento como para el promedio de CCO aislado por ovario (Tabla 2, figura 4). En contraste, diversos grupos trabajando en

especies como ovino, caprino y búfalo reportaron una mayor proporción de CCO de buena calidad aislados usando el método de cortes (Pawshe *et al.*, 1994; Shirazi *et al.*, 2005; Mehmood, *et al.*, 2011). En alpaca, sin embargo, Leisinger *et al.* (2014), reportaron una proporción significativamente mayor de CCO morfológicamente normales recuperados por el método de aspirado en comparación con el método de cortes (55.5% vs 29.6% respectivamente), mientras que Turpo *et al.* (2015) no encontraron diferencia significativa entre los promedios de CCO morfológicamente normales recuperados por ambos métodos, pero sí una tendencia a un mayor porcentaje de CCO morfológicamente normales recuperados por el método de aspiración en comparación con el método de cortes (71.1% y 61% respectivamente). Estos resultados serían concordantes con los datos obtenidos en el presente trabajo, lo que podría indicar que la aspiración es un método más adecuado para la recuperación de los CCO en esta especie.

#### **6.6 Comparación de los porcentajes de maduración y presencia de ovocitos degradados (evaluado por la presencia de ADN fragmentado) post cultivo entre los grupos de CCO aislados por los métodos de aspiración y cortes**

Con respecto a las tasas de maduración, se ha reportado el aislamiento de grupos heterogéneos de CCO y menores tasas de maduración para los ovocitos recuperados por el método de cortes en comparación con los recuperados por aspiración (Ratto *et al.*, 2005; Mehmood, *et al.*, 2011). En nuestro trabajo, sin embargo, no se encontró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) en los porcentajes de maduración para los grupos recuperados por aspiración (22.9%) y cortes (22.8%). (tabla 7, figura 8). Estos resultados coinciden con los encontrados por Pawshe *et al.* (1994), trabajando en ovocitos de cabra, quienes no reportaron diferencia significativa entre las tasas de ovocitos que alcanzaron el estadio de metafase II para los grupos aislados por ambos métodos (87.1% y 90.4% para los grupos recuperados por aspiración y cortes

respectivamente). Así mismo, tampoco se reportó diferencia significativa al evaluar las tasas de producción embrionaria entre ambos métodos (17.1% de blastocistos producidos para el grupo recuperado por aspiración y 21.6% para el grupo recuperado por cortes). Por otro lado, al evaluar las tasas de ovocitos que presentaron ADN fragmentado luego de cultivo en medio de maduración, nuestros resultados no muestran diferencia significativa entre los ovocitos provenientes de ambos grupos de aislamiento (35.5% y 38% para aspiración y cortes respectivamente).

Estos resultados podrían indicar que, si bien el método de aspiración proporciona una mayor cantidad de CCO morfológicamente normales, una vez seleccionados, los CCO provenientes de ambos métodos presentarían una capacidad equivalente para completar su maduración y permitir el desarrollo embrionario.

### **6.7 Producción de embriones por partenogénesis**

En el presente trabajo se reportó una producción de embriones por partenogénesis espontánea (sin el uso de ningún protocolo de activación química o física) del 22.7% luego de que los ovocitos fueran dejados en el medio de maduración bajo las condiciones de cultivo detalladas en la metodología, por un periodo prolongado de tiempo (120 horas). A este respecto se ha reportado que el envejecimiento del ovocito es un factor muy influyente en la activación espontánea, encontrándose que cuanto más tiempo ha pasado desde la ovulación más probable es que se produzca partenogénesis (Vallejo *et al.*, 2003). Por otro lado, se ha reportado que los agentes físicos, como la manipulación empleada para aislar los ovocitos puede ser suficiente para inducir la activación, aunque esto puede ser dependiente de la especie. En ratón, por ejemplo, Kaufman en 1978, reportó tasas de partenogénesis espontánea de entre 45-65% tras la simple manipulación necesaria para el aislamiento de los ovocitos. En humanos, sin embargo, esta simple manipulación no parece ser suficiente para la activación de los ovocitos (Abramczuk y Lopata, 1990). En nuestro caso, dado que los

eventos de partenogénesis solo ocurrieron tras un cultivo prolongado en los medios de maduración, es poco probable que la manipulación de los ovocitos haya jugado un rol importante en la activación. Por otro lado, el tiempo de envejecimiento del ovocito (120 horas) y la exposición prolongada a los agentes presentes en el medio de maduración (hormonas, factores de crecimiento y suplementos como SFB y FF), podrían haber jugado un rol clave en la activación de los ovocitos. Finalmente, con respecto a la influencia de los suplementos evaluados (SFB, FF y SFB+FF) en la tabla 8 y figura 9 se muestran los porcentajes de embriones producidos por partenogénesis espontánea para cada uno de los suplementos empleados no encontrándose diferencia significativa entre los grupos ( $p>0.05$ ).

## VII. CONCLUSIONES

- El FF puede ser usado como un suplemento natural equivalente al SFB en los medios de maduración *in vitro* para ovocitos de alpaca.
- No existe diferencia en los porcentajes de maduración *in vitro* entre los ovocitos madurados en medios suplementados con SFB, FF y SFB + FF.
- No existe diferencia en los porcentajes de expansión de las células del cumulus, producción de embriones y degradación de ovocitos entre los medios suplementados con SFB, FF y SFB + FF.
- La capacidad de los gametos de alpaca (ovocitos y espermatozoides) para completar los procesos de maduración, fertilización y desarrollo embrionario sería susceptible al almacenamiento a bajas temperaturas durante periodos prolongados de tiempo. Sin embargo, los gametos que logran alcanzar la madurez conservan la capacidad para el desarrollo post FIV representando una fuente de material genético para la conservación de esta especie.
- La proporción de CCO de las clases I y II recuperados por medio del método de aspirado es mayor, en comparación con el método de cortes, sin embargo, una vez seleccionados los CCO provenientes de ambos métodos, estos presentan una capacidad equivalente para completar su maduración y permitir el desarrollo embrionario.

## **VIII. RECOMENDACIONES**

- Utilizar ambos métodos de aislamiento (aspiración y cortes) para maximizar el número de CCO de las categorías I y II recuperados.
- Utilizar el FF o SFB como suplementos equivalentes en los medios de maduración de ovocitos de alpaca, sin embargo, no se recomienda su uso en conjunto.
- Evaluar nuevos sistemas para el transporte de las muestras biológicas (ovarios y testículos).

## IX. BIBLIOGRAFÍA

Abramczuk, J. W., & Lopata, A. (1990). Resistance of human follicular oocytes to parthenogenetic activation: DNA distribution and content in oocytes maintained *in vitro*. *Human Reproduction*, 5(5), 578-581.

Agung, B., Piao, Y., Fuchimoto, D., Senbon, S., Onishi, A., Otoi, T., & Nagai, T. (2010). Effects of oxygen tension and follicle cells on maturation and fertilization of porcine oocytes during *in vitro* culture in follicular fluid. *Theriogenology*, 73(7), 893-899.

Algriany, O., Bevers, M., Schoevers, E., Colenbrander, B., & Dieleman, S. (2004). Follicle size-dependent effects of sow follicular fluid on *in vitro* cumulus expansion, nuclear maturation and blastocyst formation of sow cumulus oocytes complexes. *Theriogenology*, 62(8), 1483-1497.

Anguita, B., Paramio, M. T., Morato, R., Romaguera, R., Jimenez-Macedo, A. R., Mogas, T., & Izquierdo, D. (2009). Effect of the apoptosis rate observed in oocytes and cumulus cells on embryo development in prepubertal goats. *Animal reproduction science*, 116(1-2), 95-106.

Araújo, V. R., Gastal, M. O., Figueiredo, J. R., & Gastal, E. L. (2014). *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. *Reproductive biology and endocrinology*, 12(1), 78.

Arav, A., Zeron, Y., Leslie, S. B., Behboodi, E., Anderson, G. B., & Crowe, J. H. (1996). Phase transition temperature and chilling sensitivity of bovine oocytes. *Cryobiology*, 33(6), 589-599.

Arriaga, I., Huanca, W., Terreros, M., Becerra, J. J., García, P., & Ampuero, A. (2014). Efecto de Temperatura y Tiempo de Almacenamiento de Ovarios de Alpacas sobre la Tasa de Maduración y División *in vitro* de Ovocitos. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(4), 477-486.

Bakker, J., & Baum, M. J. (2000). Neuroendocrine regulation of GnRH release in induced ovulators. *Frontiers in neuroendocrinology*, 21(3), 220-262.

Berland, M. A., Ulloa-Leal, C., Barría, M., Wright, H., Dissen, G. A., Silva, M. E., Ojeda, S. R. & Ratto, M. H. (2016). Seminal plasma induces ovulation in llamas in the absence of a copulatory stimulus: role of nerve growth factor as an ovulation-inducing factor. *Endocrinology*, 157(8), 3224-3232.

Bijttebier, J., Van Soom, A., Meyer, E., Mateusen, B., & Maes, D. (2008). Preovulatory follicular fluid during *in vitro* maturation decreases polyspermic fertilization of cumulus-intact porcine oocytes: *in vitro* maturation of porcine oocytes. *Theriogenology*, 70(4), 715-724.

Bravo, P. W., & Sumar, J. (1989). Laparoscopic examination of the ovarian activity in alpacas. *Animal reproduction science*, 21(3-4), 271-281.

Brown, B. W. (2000). A review on reproduction in South American camelids. *Animal reproduction science*, 58(3-4), 169-195.

Casillas, F., Teteltitla-Silvestre, M., Ducolomb, Y., Lemus, A. E., Salazar, Z., Casas, E., & Betancourt, M. (2014). Co-culture with granulosa cells improves the *in vitro* maturation ability of porcine immature oocytes vitrified with cryolock. *Cryobiology*, 69(2), 299-304.

Casillas, F., Ducolomb, Y., Lemus, A. E., Cuello, C., & Betancourt, M. (2015). Porcine embryo production following *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection from vitrified immature oocytes matured with a granulosa cell co-culture system. *Cryobiology*, 71(2), 299-305.



Combelles, C. M. H., Cekleniak, N. A., Racowsky, C., & Albertini, D. F. (2002). Assessment of nuclear and cytoplasmic maturation in in-vitro matured human oocytes. *Human Reproduction*, 17(4), 1006-1016.

Combelles, C. M. (2013). The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *International Journal of Developmental Biology*, 56(10-11-12), 819-831.

Chileno, M., Cainzo, J. Huanca W. L., Condori, R. P., García P. H. & Becerra, J. J. (2014). Evaluación de Cuatro Tiempos de Cultivo sobre la Tasa de Maduración y División Posfecundación *in vitro* de Ovocitos de Alpaca. *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 25(4), 468-476.

Chuquitaype, M., & Erón, R. (2015). Adaptación de un protocolo de fertilización *in vitro* para alpacas (*Vicugna pacos*) y su evaluación a 4200 msnm en el departamento de Puno. Tesis para optar por el título de Ingeniero Biotecnólogo. Universidad católica de Santa María

Daen, F. P., Sato, E., Naito, K., & Toyoda, Y. (1994). The effect of pig follicular fluid fractions on cumulus expansion and male pronucleus formation in porcine oocytes matured and fertilized *in vitro*. *Journal of reproduction and fertility*, 101(3), 667-673.

Dalvit, G., Llanes, S. P., Descalzo, A., Insani, M., Beconi, M., & Cetica, P. (2005). Effect of alpha-tocopherol and ascorbic acid on bovine oocyte *in vitro* maturation. *Reproduction in Domestic Animals*, 40(2), 93-97.

De Loos, F., Van Vliet, C., van Maurik, P. V., & Kruip, T. A. (1989). Morphology of immature bovine oocytes. *Gamete research*, 24(2), 197-204.

De Matos, D. G. (1999). Producción de embriones de bovinos *in vitro*: Estimulación de la síntesis de glutatión durante la maduración *in vitro* de ocitos y su efecto sobre el

desarrollo de los embriones (Doctoral dissertation, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires).

Dias, F. C. F., Khan, M. I. R., Adams, G. P., Sirard, M. A., & Singh, J. (2014). Granulosa cell function and oocyte competence: super-follicles, super-moms and super-stimulation in cattle. *Animal reproduction science*, 149(1-2), 80-89.

Dumesic, D. A., Meldrum, D. R., Katz-Jaffe, M. G., Krisher, R. L., & Schoolcraft, W. B. (2015). Oocyte environment: follicular fluid and cumulus cells are critical for oocyte health. *Fertility and sterility*, 103(2), 303-316.

Ducolomb, Y., González-Márquez, H., Fierro, R., Jiménez, I., Casas, E., Flores, D., Bonilla, E., Salazar, Z. & Betancourt, M. (2013). Effect of porcine follicular fluid proteins and peptides on oocyte maturation and their subsequent effect on *in vitro* fertilization. *Theriogenology*, 79(6), 896-904.

Fernández Baca, S. (1971). La alpaca: reproducción y crianza. *Boletín de divulgación*, 9(7).

Fernández Baca, S. (2005). Situación actual de los camélidos sudamericanos en Perú. Proyecto de Cooperación Técnica en apoyo de la crianza y aprovechamiento de los Camélidos Sudamericanos en la Región Andina TCP/RLA/2914. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO).

Fernández-Reyez, F., Ducolomb, Y., Romo, S., Casas, E., Salazar, Z., & Betancourt, M. (2012). Viability, maturation and embryo development *in vitro* of immature porcine and ovine oocytes vitrified in different devices. *Cryobiology*, 64(3), 261-266.

Germoush, M. O., Al-Mutary, M. G., Al-himaidi, A. R., Al-Ghadi, M. G., Iwamoto, D., Al-anazi, Y., Ammari, A., Ahmad, J. & Al-Khedhairi, A. (2018). Effects of Follicular Fluid

on Developmental Competence and Gene Expression of *in vitro* Fertilized Sheep Embryos. Pakistan Journal of Zoology, 50(4), 1267-1277.

Gigli, I., Russo, A., & Agüero, A. (2006). Consideraciones sobre la dinámica ovárica en equino, bovino y camélidos sudamericanos. InVet, 8(1), 183-204.

Gilbert, S. F. (2005). Biología del desarrollo. Ed. Médica Panamericana.

Hafez, E. S. E., & Hafez, B. (2000). Reproducción e inseminación artificial en animales. McGraw-hill.

Herrera Gamboa, L. V., Rojas, J., & Orlando, O. (2009). Comparación de dos suplementos para maduración de ovocitos ovinos *in vitro*.

Holt, W. V., & Pickard, A. R. (1999). Role of reproductive technologies and genetic resource banks in animal conservation. Reviews of reproduction, 4(3), 143-150.

Hutt, K. J., & Albertini, D. F. (2007). An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. Reproductive biomedicine online, 14(6), 758-764.

Ito, M., Iwata, H., Kitagawa, M., Kon, Y., Kuwayama, T., & Monji, Y. (2008). Effect of follicular fluid collected from various diameter follicles on the progression of nuclear maturation and developmental competence of pig oocytes. Animal reproduction science, 106(3-4), 421-430.

Jee, B. C., Han, S. H., Moon, J. H., Suh, C. S., Kim, S. H., & Seoul National University College of Medicine Assisted Reproductive Technology (SMART) Study Group. (2008). Influence of well-defined protein source on *in vitro* maturation of human oocyte: human follicular fluid versus human serum albumin. Fertility and sterility, 89(2), 348-352.

Jiménez, C. E. P., Espada, C. M., & Vázquez, M. D. C. (2010). Camélidos sudamericanos clasificación, origen y características/South american camelids:

Classification, origen and characteristics. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias, 4(1), 23.

John, A., Joseph, M., Vijayakumaran, V., & Manoj, C. J. (2015). Effect of oocyte retrieval techniques on yield and quality of caprine oocytes. IOSR J Agric Vet Sci, 8, 2319-2372.

Kakkassery, M. P., Vijayakumaran, V., & Sreekumaran, T. (2010). Effect of cumulus oocyte complex morphology on *in vitro* maturation of bovine oocytes. Anim. Sci.

Kane, M. T. (2003). A review of *in vitro* gamete maturation and embryo culture and potential impact on future animal biotechnology. Animal reproduction science, 79(3-4), 171-190.

Kim, B. K., Javed, M. A., Kang, S. R., Kim, D. E., Han, C. H., Huh, M. K., & Kamal, T. (2008). Effects of spermatozoa during *in vitro* meiosis progression in the porcine germinal vesicle oocytes. Animal reproduction science, 104(1), 83-92.

Klumpp, A. M. (2004). The effect of holding bovine oocytes in follicular fluid on subsequent fertilization and embryonic development.

Leisinger, C. A., Coffman, E. A., da Silva, M. C., Forshey, B. S., & Pinto, C. R. F. (2014). Factors affecting *in vitro* maturation of alpaca (*Lama pacos*) oocytes. Animal reproduction science, 150(1-2), 70-75.

López, W. H. 2014. Susceptibilidad del cuerpo lúteo a la acción de la prostaglandina F2a en alpacas inducidas a ovulación con plasma seminal.

Mamani, G. D. (2015). Métodos de selección espermática y tasa de fecundación *in vitro* en ovocitos de alpaca (*Vicugna pacos*). Tesis para optar por el grado de magister en scientiae en producción animal. Universidad Nacional Agraria La Molina.

- Matsukawa, K., Akagi, S., Adachi, N., Sato, F., Hasegawa, T., & Takahashi, S. (2007). *In vitro* development of equine oocytes from preserved ovaries after intracytoplasmic sperm injection. *Journal of Reproduction and Development*, 53(4), 877-885.
- Matsushita, S., Tani, T., Kato, Y., & Tsunoda, Y. (2004). Effect of low-temperature bovine ovary storage on the maturation rate and developmental potential of follicular oocytes after *in vitro* fertilization, parthenogenetic activation, or somatic cell nucleus transfer. *Animal reproduction science*, 84(3-4), 293-301.
- Mehmood, A., Anwar, M., Andrabi, S. M. H., Afzal, M., & Naqvi, S. M. S. (2011). *In vitro* maturation and fertilization of buffalo oocytes: the effect of recovery and maturation methods. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 35(6), 381-386.
- Miragaya, M. H., Chaves, M. G., & Agüero, A. (2006). Reproductive biotechnology in South American camelids. *Small Ruminant Research*, 61(2-3), 299-310.
- Mucci, N., Aller, J. F., Kaiser, G. G., Hozbor, F., & Alberio, R. H. (2006). Producción *in vitro* de embriones bovinos: suplementación de los medios de cultivo con suero. *Archivos de medicina veterinaria*, 38(2), 97-104.
- Naoi, H., Otoi, T., Shimamura, T., Karja, N. W. K., Agung, B., Shimizu, R., Taniguchi, M. & Nagai, T. (2007). Developmental competence of cat oocytes from ovaries stored at various temperature for 24 h. *Journal of Reproduction and Development*, 53(2), 271-277.
- Oberlender, G., Murgas, L. D. S., Zangeronimo, M. G., da Silva, A. C., de Alcantara Menezes, T., Pontelo, T. P., & Vieira, L. A. (2013). Role of insulin-like growth factor-I and follicular fluid from ovarian follicles with different diameters on porcine oocyte maturation and fertilization *in vitro*. *Theriogenology*, 80(4), 319-327.

Pacompia, M. H. (2017). Efecto de las gonadotropinas en la maduración y fertilización de ovocitos en alpacas (*Vicugna pacos*). Tesis para optar por el título profesional de Médico Veterinario y Zootecnia. Universidad Nacional del Altiplano.

Pawshe, C. H., Totey, S. M., & Jain, S. K. (1994). A comparison of three methods of recovery of goat oocytes for *in vitro* maturation and fertilization. *Theriogenology*, 42(1), 117-125.

Peña, M., Góngora, A., & Estrada, J. (2007). Growth factors in the follicular development, embrionic early and implantation. Implications in the production of bovine embryos. *Revista MVZ Córdoba*, 12(1), 942-954.

Pérez Durand, M. G., Zevallos Aragón, J. P., & Perez Guerra, U. H. (2017). Comparación de sistemas de cultivo de embriones de alpacas. *Revista de Investigaciones Altoandinas*, 19(2), 157-164.

Ratto, M., Berland, M., Huanca, W., Singh, J., & Adams, G. P. (2005). *In vitro* and *in vivo* maturation of llama oocytes. *Theriogenology*, 63(9), 2445-2457.

Remião, M. H., Lucas, C. G., Domingues, W. B., Silveira, T., Barther, N. N., Komninou, E. R., Basso, A. C., Jornada, D. S., Beck, R. C., Pohlmann, A. R., Junior, A. S. V., Seixas, F. K., Campos, V. F., Guterres, S. S. & Collares, T. (2016). Melatonin delivery by nanocapsules during *in vitro* bovine oocyte maturation decreased the reactive oxygen species of oocytes and embryos. *Reproductive toxicology*, 63, 70-81.

Ruiz, J., Santayana, R. P., Mendoza, M. J., Landeo, J. L., Huamán, E., Ticllacuri, F., Mujica, L. F., Silva M. & Ratto, M. H. (2017). Effect of oocyte maturation time, sperm selection method and oxygen tension on *in vitro* embryo development in alpacas. *Theriogenology*, 95, 127-132.

Santiani Alexei; Alejandra Ugarelli; Shirley Evangelista-Vargas. 2016. Characterization of functional variables in epididymal alpaca (*Vicugna pacos*) sperm using imaging flow cytometry. *Animal Reproduction Science* 173: 49–55.

Shirazi, A., Shams-Esfandabadi, N., & Hosseini, S. M. (2005). A comparison of two recovery methods of ovine oocytes for *in vitro* maturation. *Small Ruminant Research*, 58(3), 283-286.

Silva, J. R. V., Van Den Hurk, R., & Figueiredo, J. R. (2016). Ovarian follicle development *in vitro* and oocyte competence: advances and challenges for farm animals. *Domestic animal endocrinology*, 55, 123-135.

Solano, R. (1994). Short term preservation of intrafollicular oocytes at 4 C. *Theriogenology*, 41, 299-abstract.

Tao, T., Rath, D., & Niemann, H. (1995). *In vitro* maturation of porcine cumulus-oocyte-complexes in the presence of follicular fluid, and IVF and culture to blastocyst stages. *Theriogenology*, 1(43), 334.

Tatemoto, H., Muto, N., Sunagawa, I., Shinjo, A., & Nakada, T. (2004). Protection of porcine oocytes against cell damage caused by oxidative stress during *in vitro* maturation: role of superoxide dismutase activity in porcine follicular fluid. *Biology of Reproduction*, 71(4), 1150-1157.

Turpo, N. F. V., Durand, M. G. P., Marocho, L. V. O., & Guerra, U. H. P. (2015). Efecto de dos métodos de colección sobre la cantidad y calidad ovocitaria de alpacas (*vicugna pacos*) y llamas (*lama glama*) post mórtem. *Revista Investigaciones Altoandinas*, 17(3), 10.

Vallejo, J., Gómez-Piquer, V., & Tarín, J. J. (2003). Inducción de la partenogénesis en ovocitos de mamíferos. *Rev Iberoam Fertil Reprod Hum*, 20, 177-187.

- Van Woudenberg, A. B., Gröllers-Mulderij, M., Snel, C., Jeurissen, N., Stierum, R., & Wolterbeek, A. (2012). The bovine oocyte *in vitro* maturation model: a potential tool for reproductive toxicology screening. *Reproductive Toxicology*, 34(2), 251-260.
- Wani, N. A., & Nowshari, M. A. (2005). Kinetics of nuclear maturation and effect of holding ovaries at room temperature on *in vitro* maturation of camel (*Camelus dromedarius*) oocytes. *Theriogenology*, 64(1), 75-85.
- Wigglesworth, K., Lee, K. B., O'Brien, M. J., Peng, J., Matzuk, M. M., & Eppig, J. J. (2013). Bidirectional communication between oocytes and ovarian follicular somatic cells is required for meiotic arrest of mammalian oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 201314829.
- Włodarczyk, R., Bukowska, D., Jackowska, M., Mucha, S., & Jaskowski, J. M. (2009). *In vitro* maturation and degeneration of domestic cat oocytes collected from ovaries stored at various temperatures. *Veterinarni Medicina*, 54(10), 491-497.
- Yang, Z. Y., & Chian, R. C. (2017). Development of *in vitro* maturation techniques for clinical applications. *Fertility and sterility*, 108(4), 577-584.
- Yoon, K. W., Shin, T. Y., Park, J. I., Roh, S., Lim, J. M., Lee, B. C., ... & Lee, E. S. (2000). Development of porcine oocytes from preovulatory follicles of different sizes after maturation in media supplemented with follicular fluids. *Reproduction, Fertility and Development*, 12(4), 133-139.
- Yoshino, O., McMahon, H. E., Sharma, S., & Shimasaki, S. (2006). A unique preovulatory expression pattern plays a key role in the physiological functions of BMP-15 in the mouse. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(28), 10678-10683.



Yuan, Y. Q., Van Soom, A., Leroy, J. L. M. R., Dewulf, J., Van Zeveren, A., de Kruif, A., & Peelman, L. J. (2005). Apoptosis in cumulus cells, but not in oocytes, may influence bovine embryonic developmental competence. *Theriogenology*, 63(8), 2147-2163.

Zhao, X. M., Wang, N., Hao, H. S., Li, C. Y., Zhao, Y. H., Yan, C. L., Wang, H. I., Du, W. H., Wang, D., Pang, Y. W. & Zhu, H. B. (2018). Melatonin improves the fertilization capacity and developmental ability of bovine oocytes by regulating cytoplasmic maturation events. *Journal of pineal research*, 64(1), e12445.

## VI. ANEXOS



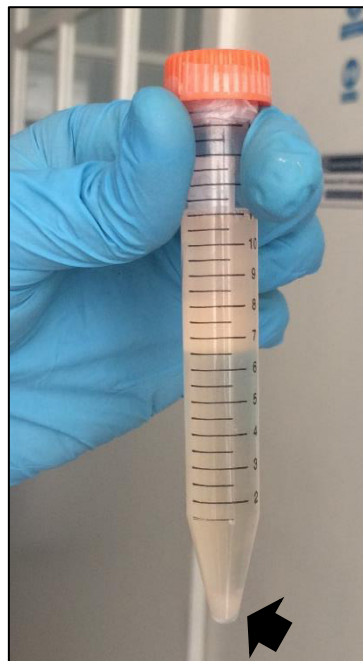
**Figura 10:** Camal Municipal de Huancavelica



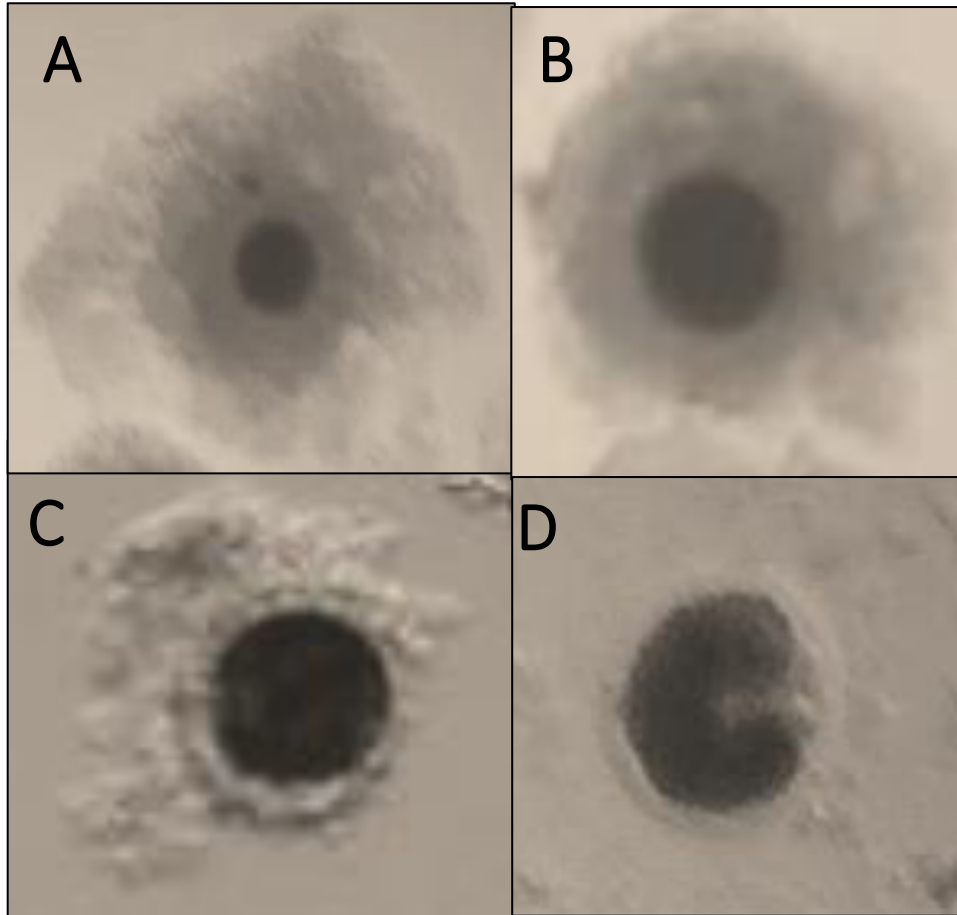
**Figura 11:** Preparación de medios y placas de cultivo



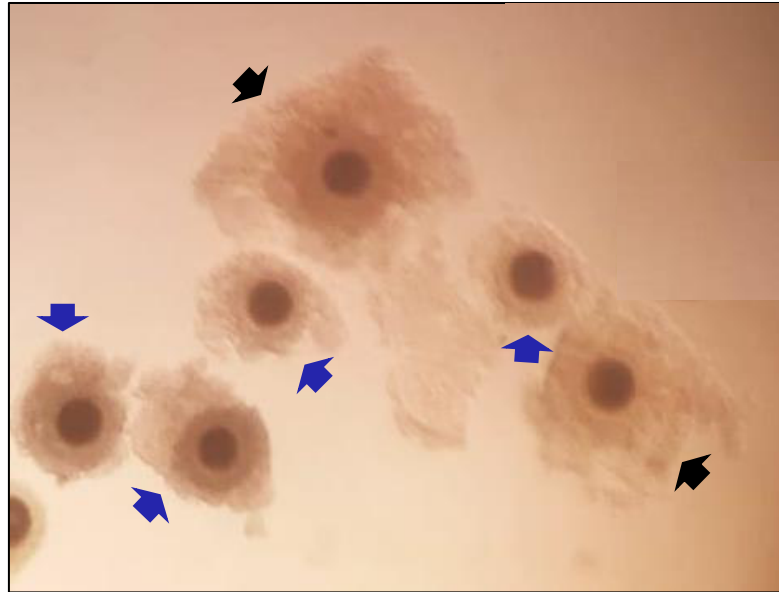
**Figura 12:** Ovario de alpaca.  
Aumento 2X



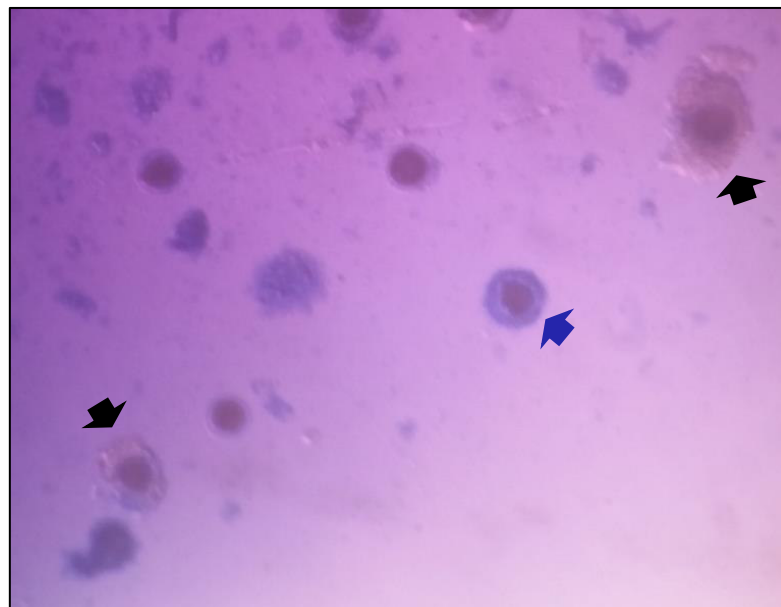
**Figura 13:** Fluido folicular aspirado + solución  
Dulbecco. La flecha indica el pellet donde se  
encuentran los ovocitos



**Figura 14:** Clasificación morfológica de los complejos cumulus-ovocitos inmaduros. A: Clase I. B: Clase II. C: Clase III y D: Clase IV. Aumento 45X

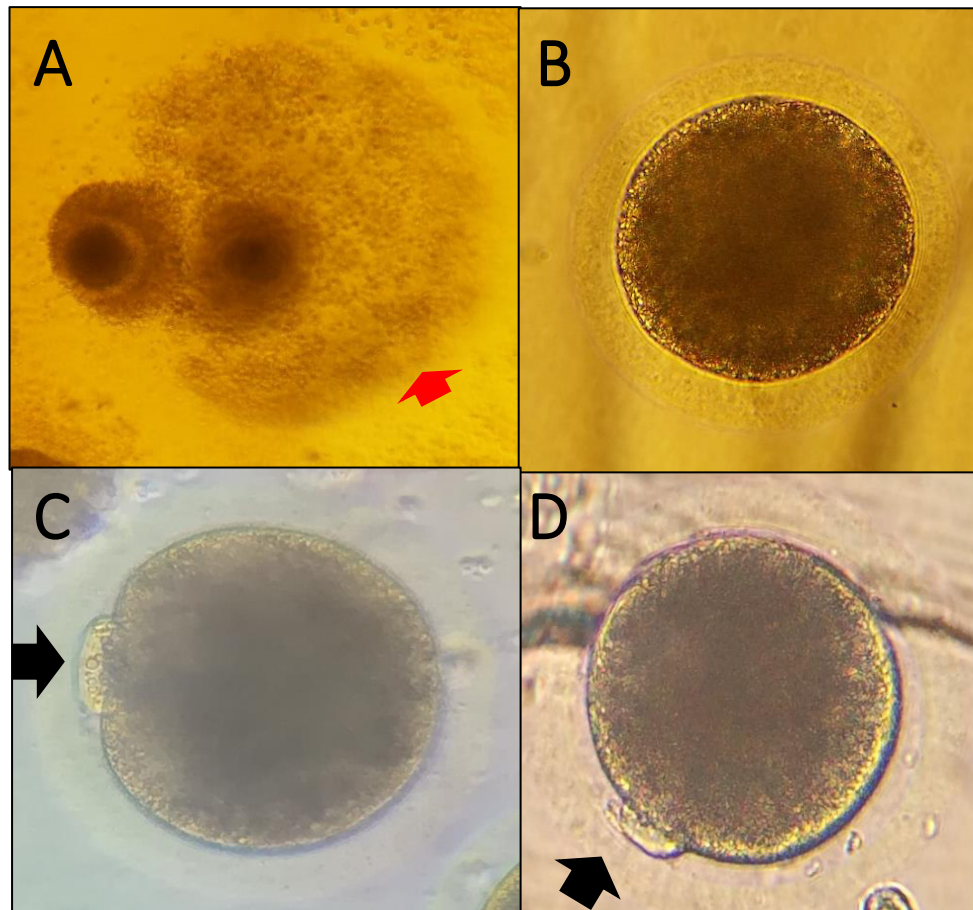


**Figura 15:** Ovocitos seleccionados para maduración *in vitro*. Clase I (flechas negras) y clase II (flechas azules).  
Aumento 45X



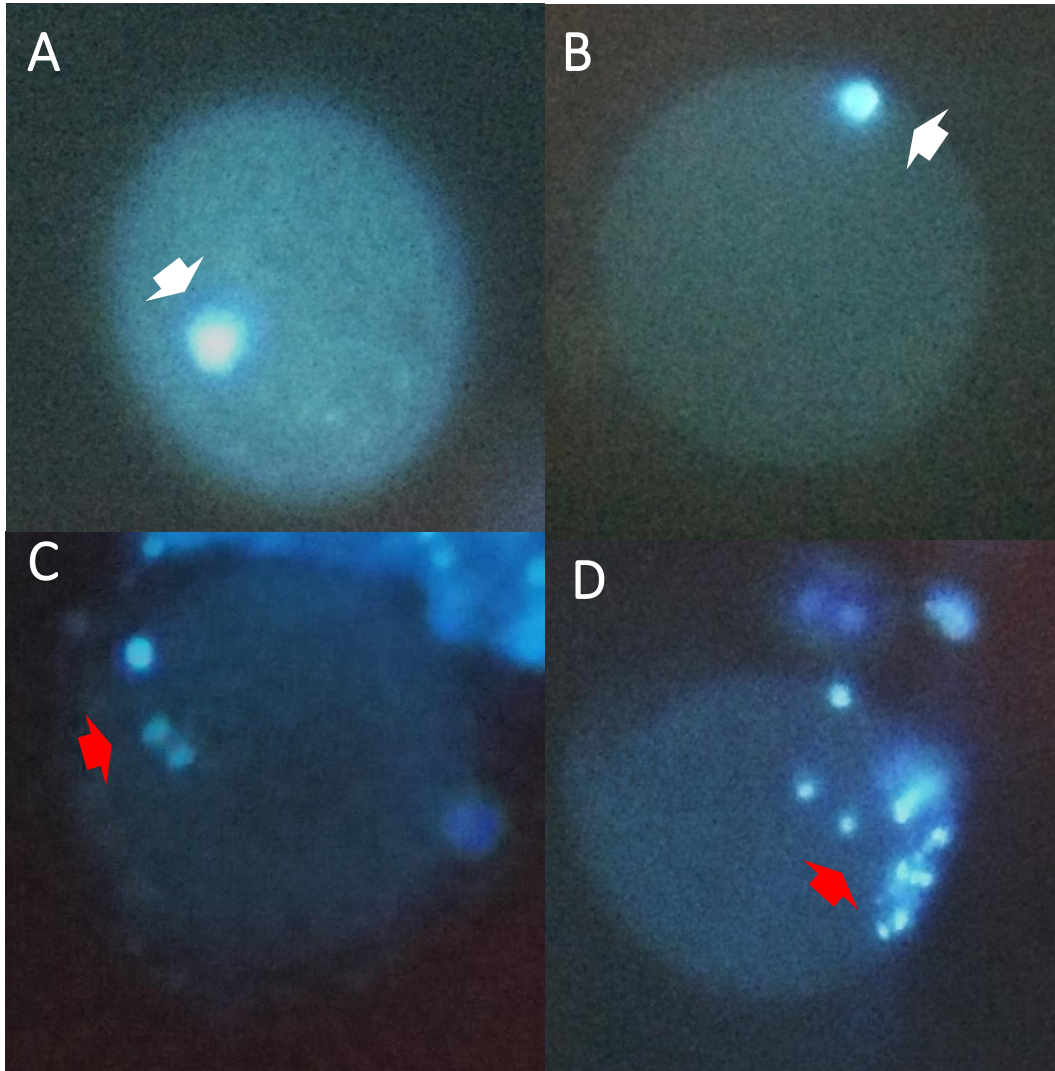
**Figura 16:** Evaluación de los ovocitos mediante tinción con el colorante vital azul de tripán. Ovocitos vivos (flechas negras) y ovocitos muertos (flechas azules).  
Aumento 45X



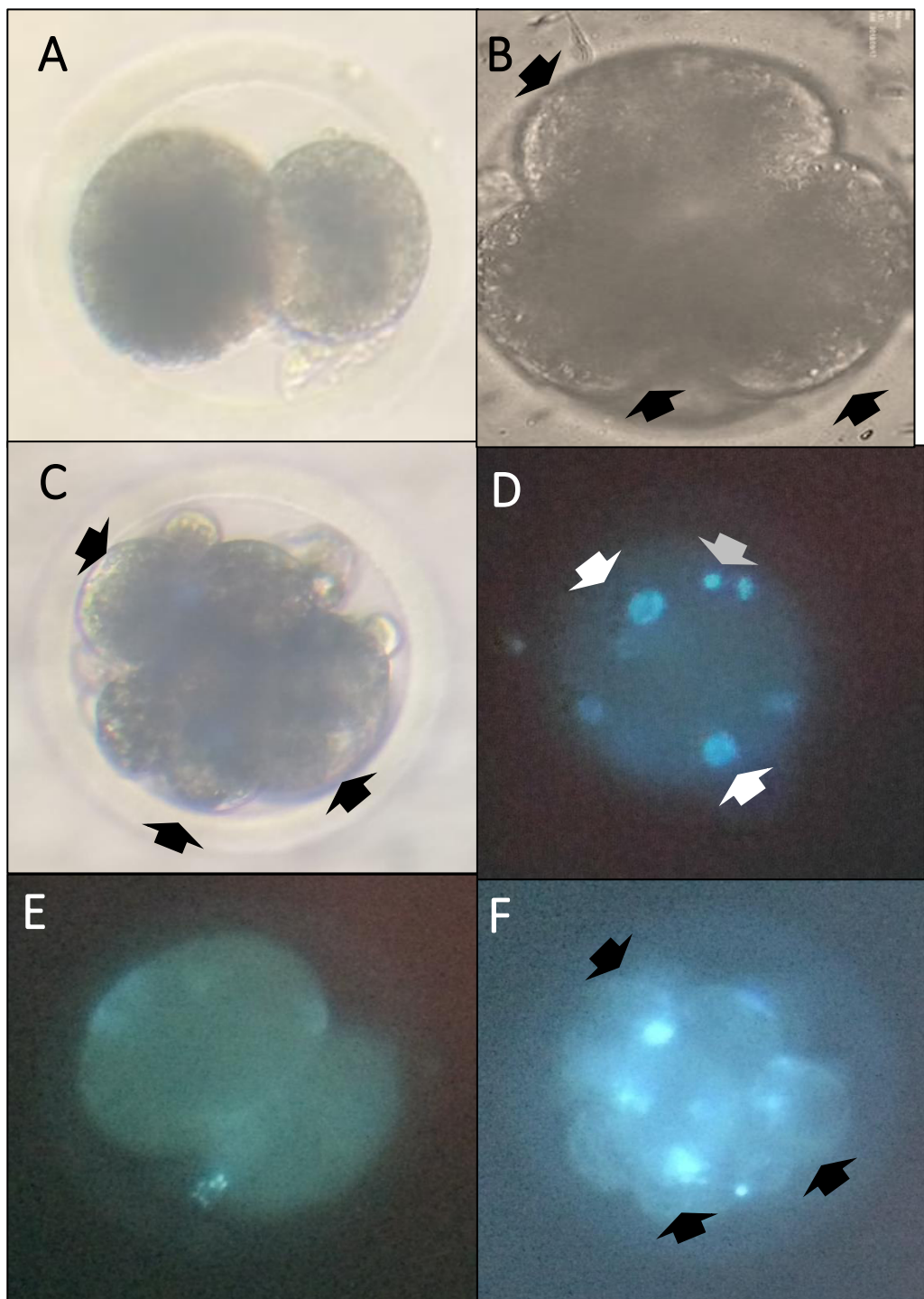


**Figura 17:** Ovocitos de alpaca post-maduración. A: Ovocito con las células del cúmulus expandidas, flecha roja. B: Ovocito inmaduro. C y D: Ovocitos maduros, las flechas negras indican los cuerpos polares.

Aumento 250X



**Figura 18:** Ovocitos inmaduros en diferentes estadios de meiosis evaluados por microscopía de fluorescencia. A: Vesícula germinal. B: Metafase I. C: Metafase II y D: Ovocitos con ADN degradado. Las flechas blancas señalan los núcleos en los estadios correspondientes a cada fase, mientras que las flechas rojas señalan la placa metafásica y ADN fragmentado en las secciones C y D respectivamente. Aumento 250X



**Figura 19:** **A:** Embrión de 2 células. **B:** Embrión de 4 células. **C:** Mórula y **D:** Ovocito fecundado (las flechas blancas señalan los pronúcleos y la flecha ploma señala los cuerpos polares). **E:** Embrión de 2 células **F:** Mórula (Las fotos D, E & F fueron evaluados por microscopía de fluorescencia). Las flechas negras señalan los blastómeros. Aumento 250X



**Tabla 09:** Número de ovarios, CCO de las categorías I y II recuperados por aspiración y cortes y vitalidad de los CCO.

	# ovarios	# CCO recuperados por experimento por aspiración	CCO recuperados por ovario por aspiración	# CCO recuperados por cortes	CCO recuperados por ovario por el método de cortes	% vitalidad
<b>03/05/18</b>	18	67	3.7	-	-	12.5%
<b>07/06/18</b>	10	21	2.1	-	-	42%
<b>12/06/18</b>	40	62	1.6	-	-	50%
<b>14/06/18</b>	28	35	1.3	-	-	22.2%
<b>04/07/18</b>	17	44	2.6	-	-	-
<b>11/07/18</b>	14	57	4.1	-	-	33.3%
<b>17/07/18</b>	24	61	2.5	-	-	40%
<b>28/08/18</b>	21	45	2.1	-	-	23%
<b>05/09/18</b>	38	49	1.3	-	-	-
<b>06/09/18</b>	28	55	2.0	-	-	-
<b>12/09/18</b>	35	47	1.3	12	0.3	-
<b>13/09/18</b>	20	85	4.3	42	2.1	-
<b>26/09/18</b>	26	81	3.1	48	1.8	-
<b>27/09/18</b>	19	80	4.2	30	1.6	-
<b>03/10/18</b>	52	128	2.5	37	0.7	-
<b>04/10/18</b>	22	66	3.0	20	0.9	-
<b>Promedio</b>	412	52.6±17.8	2.1±0.8	34.9 ±13.1	1.2±0.7	32.6 ± 14.8

**Tabla 10:** Porcentajes de expansión de las células del cumulus y maduración de los ovocitos aislados por aspiración y cultivados en los medios con los suplementos

evaluados (SFB, FF y SFB+FF).

Suplementos	% Expansión del cumulus			% Maduración		
	SFB	SFB+FF	FF	SFB	SFB+FF	FF
03/05/18	-	-	-	40.5	50.0	-
07/06/18	-	-	-	18.2	10.0	-
12/06/18	-	-	-	50.0	23.5	-
14/06/18	-	-	-	11.8	11.1	-
04/07/18	-	-	-	25.0	5.0	-
11/07/18	-	-	-	38.5	32.3	-
17/07/18	-	-	-	32.3	16.7	-
28/08/18	17.0	75.0	77.0	16.7	10.0	23.1
05/09/18	58.3	66.7	61.5	25.0	12.5	30.8
06/09/18	94.4	70.0	88.2	16.7	5.0	5.9
12/09/18	75.0	72.7	100.0	41.7	9.1	41.7
13/09/18	-	-	-	14.3	26.7	21.4
26/09/18	63.6	54.5	90.9	36.4	36.4	40.0
27/09/18	100.0	58.8	50.0	0	11.8	14.3
03/10/18	76.7	74.2	83.3	10.0	16.1	16.7
04/10/18	-	-	-	31.2	31.2	28.6
<b>Promedio</b>	69.3±27.5	67.4±8.0	78.7±17.5	25.5±13.8	19.2±12.9	24.7±11.8

**Tabla 11:** Porcentajes de expansión de las células del cumulus y maduración de los ovocitos aislados por cortes y cultivados en los medios con los suplementos evaluados (SFB, FF y SFB+FF)

<b>Suplementos</b>	<b>% Expansión del cumulus</b>			<b>% Maduración</b>		
	<b>SFB</b>	<b>SFB+FF</b>	<b>FF</b>	<b>SFB</b>	<b>SFB+FF</b>	<b>FF</b>
<b>13/09/18</b>	-	-	-	42.9	26.7	30.8
<b>26/09/18</b>	70.6	31.3	80.0	11.8	12.5	-
<b>27/09/18</b>	88.9	81.8	100	22.2	0	0
<b>03/10/18</b>	30.8	72.7	53.8	46.1	9.0	30.8
<b>04/10/18</b>	-	-	-	43.0	0	43.0
<b>Promedio</b>	63.4±29.7	61.9±26.9	77.9±23.2	33.2±15.3	9.6±11.0	26.1±18.4

**Tabla 12:** Estadíos nucleares encontrados en los ovocitos inmaduros aislados por aspiración

Suplementos	% VG				% MI				% Ovocitos degradados			
	SFB	SFB+FF	FF	SFB	SFB+FF	FF	SFB	SFB+FF	SFB	SFB+FF	FF	FF
13/09/18	28.6	20.0	14.3	14.3	20.0	7.1	42.3	33.3	57.1			
26/09/18	45.5	45.5	20.0	0	9.1	20.0	18.2	9.1	18.2			
27/09/18	50.0	23.5	21.4	37.5	17.6	14.3	12.5	47.1	43.8			
03/10/18	29.6	3.7	27.6	7.4	7.4	17.2	46.7	61.3	36.7			
04/10/18	18.8	18.8	28.6	6.3	6.3	7.1	-	-	-			
Promedio	34.5±12.9	22.3±15.0	22.4±5.9	13.1±14.6	4.3±6.3	13.1±5.9	29.9±17.1	37.7±22.2	38.9±16.2			

Tabla 13: Estadíos nucleares encontrados en los ovocitos inmaduros aislados por el método de cortes

Suplementos	% VG				% MI				% Ovocitos degradados			
	SFB	SFB+FF	FF	SFB	SFB+FF	FF	SFB	SFB+FF	SFB	SFB+FF	FF	SFB
13/09/18	28.6	20	14.3	0	13.3	8.3	21.4	33.3	23.1			
26/09/18	45.5	45.5	20.0	23.5	0	-	58.8	25.0	-			
27/09/18	50.0	23.5	21.4	0	25.0	12.5	55.6	50.0	55.6			
03/10/18	29.6	3.7	27.6	14.3	15.4	30.8	30.8	27.3	36.7			
04/10/18	18.8	18.8	28.6	0	0	14.3	-	-	-			
Promedio	13.7±6.9	31.8±8.3	22.0±8.9	7.6±10.9	10.7±10.8	16.5±9.9	41.7±18.4	33.9±11.3	38.5±16.3			

**Tabla 14:** Porcentajes de embriones producidos por los ovocitos madurados en los medios con los suplementos evaluados

	<b>Aspirado + cortes</b>		
	<b>SFB</b>	<b>SFB+FF</b>	<b>FF</b>
<b>12/09/18</b>	60.0	100	40.0
<b>26/09/18</b>	50.0	16.7	16.7
<b>27/09/18</b>	0	0	0
<b>03/10/18</b>	0	0	0
<b>Promedio</b>	27.5±32.0	29.2±47.9	14.2±18.9